



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

VACINAÇÃO DE PATOS-REAIS (*Anas platyrhynchos*)
CONTRA A GRIPE AVIÁRIA EM PORTUGAL

LILIANE FERREIRA CABRAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Dr.^a Alexandra Maria de Matos Fernandes

ORIENTADOR

Dr.^a Alexandra Maria de Matos Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

VACINAÇÃO DE PATOS-REAIS (*Anas platyrhynchos*)
CONTRA A GRIPE AVIÁRIA EM PORTUGAL

LILIANE FERREIRA CABRAL

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Dr.^a Alexandra Maria de Matos Fernandes

ORIENTADOR

Dr.^a Alexandra Maria de Matos Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

2009

LISBOA

*Dedico esta tese à minha querida avó Cinda, que me segurou nos seus braços
com amor desde o primeiro dia da minha vida até ao último dia da sua,
estando comigo em todos os momentos do meu crescimento, testemunhando
orgulhosa o meu esforço para concluir esta etapa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, aos meus pais e ao meu irmão pelo seu amor e carinho incondicionais, pelos valores que me transmitiram, por sempre acreditarem em mim e pelo seu apoio e incentivo nos momentos de incerteza e de cansaço. Ao meu namorado, Luís, pelo seu amor compreensivo e paciente, por todos os dias de trabalho roubados à tese... surpresas de contos de fada que resgataram aquela menina doce e genuinamente feliz. Ao Dr. José António Miranda pelas suas sugestões, com um beijinho especial também para a Suzana e a Rita por terem partilhado comigo as emoções despertadas pelo progresso da tese.

Este foi um ano de trabalho árduo, uma oportunidade ímpar, tornada possível pela intervenção de duas pessoas muito importantes, a quem agradeço profundamente. À Dra. Alexandra Fernandes, Chefe da Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo Norte, Orientadora de estágio, pela disponibilidade com que me recebeu, pelo conhecimento prático e estímulo que me transmitiu e por todas as oportunidades que me proporcionou durante o estágio. Ao Professor Virgílio Almeida, da FMV, Co-orientador de estágio, por todo o seu incentivo e reconhecimento e pelo apoio técnico na redacção da tese. Um palavra de agradecimento também à Dra. Patrícia Santos, da Direcção de Serviços de Saúde e Protecção Animal, pela disponibilização de todos os dados, sem os quais a realização desta tese não seria possível.

De certo, foram momentos enriquecidos pela presença de muitas outras pessoas, também muito especiais, a quem eu gostaria de agradecer. À Dra. Cláudia Moedas do Vale, ao Eng. Rui Poitier e ao Eng. Manuel Borges Coelho, do sector de avicultura da Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo, pela simpatia com que me receberam e pelas realidade que me mostraram e sobre a qual me ensinaram, algo que não se aprende nos livros. À Luísa Cruz, por me ter acarinhado desde o primeiro dia de estágio, pelo seus companheirismo e pelos seus conselhos, e a todas as outras pessoas da Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo Norte, colegas e funcionários, pelo seu sorriso diário e pela disponibilidade.

Sete anos passados, ainda posso sentir o medo do desconhecido e a ansiedade que estiveram presentes no primeiro dia. Foi um longo período de aprendizagem, mas sobretudo de transformação. O receio deu inicialmente lugar à dúvida para que depois, enfim, pudesse descobrir apenas duas certezas: o orgulho e paixão pela profissão. Pelo que agradeço ainda o companheirismo e a amizade de alguns amigos verdadeiros, que se contam pelos dedos de duas mãos e que terão sempre um lugar especial no meu coração, e também a alguns Professores especiais, verdadeiros mestres que nos contagiaram com o seu entusiasmo e que continuarão a inspirar-me sempre.

Vacinação de Patos-reais (*Anas platyrhynchos*) contra a Gripe Aviária em Portugal

RESUMO

Na última década, a estirpe asiática H5N1 de alta patogenicidade disseminou-se rapidamente pela Ásia, Europa e África, resultando no morticínio de mais de 250 milhões de aves domésticas e na morte de mais de duas centenas de pessoas, representando uma séria ameaça à Saúde Pública. Os patos, especialmente o pato-real (*Anas platyrhynchos*), desempenham um papel importante na amplificação e na disseminação do vírus. Por conseguinte, a disponibilização de vacinas que sejam eficazes nesta espécie em condições “de campo” constitui-se como uma ferramenta importante no controlo do vírus.

O presente estudo baseia-se no programa de monitorização serológica incluído nos planos de vacinação de emergência e de vacinação preventiva implementados na sequência de um foco de gripe aviária de baixa patogenicidade, subtipo H5N2, ocorrido numa exploração cinegética nacional em Setembro de 2007. A vacinação com duas vacinas inactivadas bivalentes, H5N9/H7N1 e H5N6/H7N7, foi realizada em dois grupos de patos-reais. Posteriormente, foi realizada uma revacinação semestral num destes grupos. A vacinação induziu um título de anticorpos específicos para a hemaglutinina H5 similar nos dois grupos de patos primovacinados, acima do limiar considerado de protecção ($4 \log_2$) até pelo menos 16 semanas após a administração do reforço da vacina, tendo-se atingido uma taxa de imunização inicial superior a 80%. A revacinação semestral com o antigénio H5N6 induziu uma resposta humoral pouco exuberante, com persistência de anticorpos protectores apenas até 6 semanas após vacinação. O antigénio de subtipo H7N7 não estimulou o desenvolvimento de uma resposta imunitária humoral protectora para a hemaglutinina H7. Pelo contrário, o antigénio H7N1 induziu um título médio de anticorpos ligeiramente acima do limiar de protecção, que persistiu até pelo menos 26 semanas após o reforço da vacina. Os resultados observados sugerem que numa exploração cinegética deste tipo, em que o risco de contacto com o vírus “de campo” é muito elevado, a revacinação semestral com uma vacina adequada é uma medida complementar importante para limitar a ocorrência de focos secundários da infecção/doença.

Palavras-chave: gripe aviária; vacina inactivada; patos-reais

Vaccination of Mallard Ducks (*Anas platyrhynchos*) against Avian Influenza in Portugal

ABSTRACT

During the last decade, HPAI H5N1 has rapidly spread across Asia, Europe and Africa, leading to the culling of more than 250 million birds and the death of more than two hundred people, posing a serious threat to public health. Ducks, particularly, mallards (*Anas platyrhynchos*), play an important role in the amplification and spread of the virus. Vaccines that are effective in this species in field conditions will provide an important tool for control of the disease.

This study is based on a serological monitoring programme included in the emergency and preventive vaccination plans applied following a LPAI H5N2 outbreak in a game bird holding in Portugal, in 2007. Vaccination with two bivalent, H5N9/H7N1 and H5N6/H7N7, inactivated vaccines was carried out in two groups of mallard ducks. A second vaccination, six months later, was also carried out in one of these groups. The first vaccination induced a similar mean antibody titer specific for H5 hemagglutinin in both groups, above the protective threshold ($4 \log_2$) and persistent for at least 16 weeks after the vaccine boost. The proportion of immunized ducks was initially above 80%. Ducks revaccinated six months later with the H5N6 vaccine showed a lower antibody response, which persisted for only 6 weeks after vaccination. The H7N7 vaccine antigen did not simulate a protective immune humoral response specific for H7 hemagglutinin. On the contrary, the mean antibody titers following vaccination with the H7N1 vaccine were slightly above the threshold, persisting for at least 26 weeks after the boost. These results suggest that semestral vaccination with an adequate vaccine is as important additional measure to limit secondary AI outbreaks in this type of farming system, which is at a particularly high risk of exposure to the field virus.

Keywords: avian influenza; inactivated vaccine; mallard ducks

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RELATÓRIO DE ACTIVIDADES	ix
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA GRIPE AVIÁRIA	1
1.1. Introdução	1
1.2. O Vírus Influenza A	1
1.2.1. Estrutura da partícula viral	2
1.2.2. Fases do ciclo replicativo	3
1.2.3. Evolução genética.....	5
1.2.4. Ecologia dos vírus influenza.....	6
1.3. O Potencial Zoonótico da Gripe Aviária	8
1.3.1. O subtipo H9N2.....	11
1.3.2. Vírus pertencentes ao subtipo H7	12
1.3.3. O subtipo H5N1	13
1.4. A História da Gripe Aviária de Alta Patogenicidade.....	14
1.4.1. Itália (1999-2000)	14
1.4.2. Países Baixos (2003)	14
1.4.3. Canadá (2004)	15
1.4.4. Eurásia e África (2003 - presente).....	16
1.5. Patogenia e Sinais Clínicos	18
1.6. O Diagnóstico da Gripe Aviária	19
1.6.1. Isolamento e identificação do vírus	19
1.6.2. Serologia.....	20
1.7. O Controlo da Gripe Aviária.....	20
1.7.1. Comunicação e formação	21
1.7.2. Biossegurança.....	21
1.7.3. Vigilância e identificação de focos.....	22
1.7.4. Activação do plano de contingência da gripe aviária	24
1.7.5. Vacinação contra a gripe aviária	26
1.7.5.1. Vantagens e limitações	27
1.7.5.2. Indução da resposta imunitária	28
1.7.5.3. Tipos de vacinas disponíveis no mercado	30
1.7.5.4. Avaliação da Eficácia Vacinal.....	32
1.7.5.5. Implementação de planos de vacinação na União Europeia.....	33
CAPÍTULO 2. VACINAÇÃO DE PATOS-REAIS (<i>Anas platyrhynchos</i>)	
CONTRA A GRIPE AVIÁRIA EM PORTUGAL	38
2.1. Introdução	38
2.2. Materiais e Métodos	39
2.2.1. Caracterização da população vacinada	39
2.2.2. Protocolo vacinal	40
2.2.3. Amostragem	40
2.2.4. Titulação dos anticorpos pós-vacinais	41
2.2.5. Análise estatística	41
2.3. Resultados	41
2.3.1. Estudo 1: Resposta humoral à vacinação de emergência	41
2.3.2. Estudo 2: Resposta humoral à vacinação preventiva.....	43
2.4. Discussão	44
2.5. Conclusões	46
BIBLIOGRAFIA	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do vírus Influenza A	2
Figura 2. Estrutura do virião Influenza A.....	2
Figura 3. Ciclo replicativo do vírus Influenza A.....	4
Figura 4. Mecanismo de <i>shift</i> antigénico.....	5
Figura 5. A Gripe Espanhola	8
Figura 6. Vias de emergência de um vírus Influenza A com potencial pandémico	11
Figura 7. Capoeira doméstica no Vietname	12
Figura 8. Mercado de aves vivas em Hanoi, Vietname.....	16
Figura 9. Focos de gripe aviária de alta patogenicidade em aves domésticas e selvagens, entre Janeiro de 2005 e Maio de 2009	17
Figura 10. Sinais clínicos de gripe aviária de baixa patogenicidade nas aves domésticas.....	18
Figura 11. Sinais clínicos de gripe aviária de alta patogenicidade nas aves domésticas.....	19
Figura 12. Vigilância da gripe aviária em explorações cinegéticas	23
Figura 13. Zonas de restrição estabelecidas em caso de foco de gripe aviária	25
Figura 14. Occisão de patos-reais infectados com um vírus LPAI	26
Figura 15. Vacinação de patos-reais e colheita de sangue para serologia.....	36
Figura 16. Titulação de anticorpos (a) α -H5 e (b) α -H7 por inibição da hemaglutinação, após a vacinação de emergência.....	42
Figura 17. Titulação de anticorpos por inibição da hemaglutinação após a vacinação preventiva nos patos do grupo A (a, b) e nos patos do grupo B (c, d)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos de infecção humana por vírus da gripe aviária (1996 - 22/05/2009)	10
Tabela 2. Principais focos de gripe aviária de alta patogenicidade desde 1959	15
Tabela 3. Resposta humoral à vacinação de emergência. Titulação de anticorpos específicos para H5 e para H7 por inibição de hemaglutinação.....	42
Tabela 4. Resposta humoral à vacinação preventiva nos patos do grupo A. Titulação de anticorpos específicos para H5 e para H7 por inibição de hemaglutinação.	43
Tabela 5. Resposta humoral à vacinação preventiva nos patos do grupo B. Titulação de anticorpos específicos para H5 e para H7 por inibição de hemaglutinação.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AGID	Agar-gel imunodifusão
DGV	Direcção Geral de Veterinária
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals
DIVRN	Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo Norte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSVR	Direcção de Serviços Veterinários Regionais
DSVRLVT	Direcção de Serviços Veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
GAAP	Gripe Aviária de Alta Patogenicidade
GABP	Gripe Aviária de Baixa Patogenicidade
Gal	Galactose
HA	Hemaglutinina activa
HA0	Hemaglutinina precursora
HA1	Subunidade 1 da hemaglutinina activa
HA2	Subunidade 2 da hemaglutinina activa
HPAI	High Pathogenic Avian Influenza
IFN- γ	Interferão gama
IH	Inibição da hemaglutinação
IL-2	Interleucina 2
IPVI	Intravenous Pathogenicity Index
LNIV	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
LPAI	Low Pathogenic Avian Influenza
M1	Proteína da matriz 1
M2	Proteína da matriz 2
M2e	Domínio extracelular da proteína M2
NA	Neuraminidase
NEP	Nuclear export protein
NLS	Nuclear localization signal
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína não estrutural 1
OIE	World Organisation for Animal Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PA	Polimerase ácida
RNA	Ácido ribonucleico
RNAc	RNA complementar
RNAm	RNA mensageiro
RNAv	RNA viral
RNP	Complexo ribonucleoproteico
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SA	Ácido siálico
SCFAH	Standing Committee on the Food Chain and Animal Health
SIGSA	Sistema Informativo de Gestão de Sanidade Avícola
SPF	Specific Pathogen Free
Tc	Linfócito T citotóxico
Th	Linfócito T helper
TNF- α	Factor de necrose tumoral alfa
TRACES	Trade Control and Expert System
WHO	World Health Organization

RELATÓRIO DE ACTIVIDADES

O estágio do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado no sector de Avicultura da Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo Norte (DIVRN), com extensão ao mesmo sector da Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo (DIVR), ambas pertencentes à Direcção de Serviços Veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo.

Entre Setembro de 2008 e Dezembro de 2008, participei activamente, colaborando com os técnicos destas duas divisões, em todos os actos oficiais de inspecção e vigilância realizados, nomeadamente:

- Apreciação de processos para autorização do exercício da actividade avícola.
- Vistorias de explorações avícolas para dar cumprimento às normas mínimas de bem-estar animal, nomeadamente de galinhas poedeiras e de perus.
- Vistorias a unidades de inspecção e classificação de ovos e de ovoprodutos.
- Vistorias a viaturas de transporte de animais e de subprodutos de origem animal.
- Acções de vigilância oficial no âmbito do Programa Nacional de Controlo de Salmonelas em bandos de galinhas poedeiras e em bandos de reprodução (*Gallus gallus*), com recolha de amostras de matéria fecal para processamento laboratorial.
- Acções de vigilância activa da Gripe Aviária em explorações cinegéticas (patos, faisões e perdizes), com recolha de zaragatoas orofaríngeas e cloacais para pesquisa do vírus no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV).
- Implementação de um plano de vacinação preventiva contra a gripe aviária numa exploração cinegética de patos-reais, incluindo as acções de vigilância e monitorização pós-vacinal e que constituem o tema desta dissertação.

Durante este período, tive a oportunidade de participar ainda em duas acções de formação promovidas pela Direcção Geral de Veterinária, relativas à elaboração de certificados sanitários, no sistema TRACES (Trade Control and Expert System), para o comércio intracomunitário de animais e produtos de origem animal e à utilização do programa informático SIGSA (Sistema Informativo de Gestão de Sanidade Avícola).

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA GRIPE AVIÁRIA

1.1 Introdução

O primeiro foco de gripe aviária de alta patogenicidade foi confirmado no final dos anos 50 numa pequena exploração avícola da Escócia (Lupiani & Reddy, 2009). Durante mais de 40 anos, poder-se-á dizer que a sua incidência foi esporádica, tendo afectado pouco mais de 23 milhões de aves domésticas (Capua & Alexander, 2008). A emergência da estirpe H5N1 asiática em 1997 e a sua re-emergência e disseminação pela Ásia, a partir de 2003, e à Europa e África, no final de 2005, conduziu a uma situação sem precedentes, com a destruição de mais de 250 milhões de aves domésticas em todo o mundo, com um forte impacto económico na avicultura industrial (Food and Agriculture Organisation of the United Nations [FAO], 2009a), e com a morte de 262 pessoas (até 1/07/09), representando também uma perigosa ameaça à saúde humana (World Health Organization [WHO], 2009a). Até 20 de Maio de 2009, 62 países/ territórios foram afectados pelo H5N1, que se mantém actualmente endémico no Bangladesh, na Indonésia, no Vietname e no Egipto (FAO, 2009a), ameaçando a subsistência de milhões de pequenos produtores nestes países em vias de desenvolvimento.

1.2 O Vírus Influenza A

Os vírus Influenza são vírus RNA pertencentes à família Orthomyxoviridae. Variações nas propriedades antigénicas de proteínas existentes no interior da partícula viral, nucleoproteína (NP) e proteína da matriz (M1), diferenciam três géneros (ou tipos) de vírus Influenza: A, B e C (Palese & Shaw, 2007).

O vírus Influenza A afecta aves e mamíferos, incluindo humanos, suínos, equinos, cães, felinos e cetáceos (Fujii et al., 2007; Wright, Neumann & Kawaoka, 2007). Estes vírus são classificados em subtipos com base nas características antigénicas da hemaglutinina (HA) e da neuraminidase (NA), duas glicoproteínas expressas à superfície das partículas virais (Palese & Shaw, 2007). Até à data, foram identificadas 16 formas antigénicas de HA (H1-H16) e 9 de NA (N1-N9), formando 82 combinações diferentes (Fouchier et al., 2005). Todos estes subtipos já foram isolados em aves (Olsen et al., 2006). Apenas os subtipos H1N1, H3N2 e H1N2 circulam actualmente na população humana (Van Reeth, 2007). Os vírus Influenza B e C afectam predominantemente a espécie humana, tendo o vírus de tipo B sido isolado também em focas (Ohishi et al., 2002; Osterhaus, Rimmelzwaan, Martina, Bestebroer

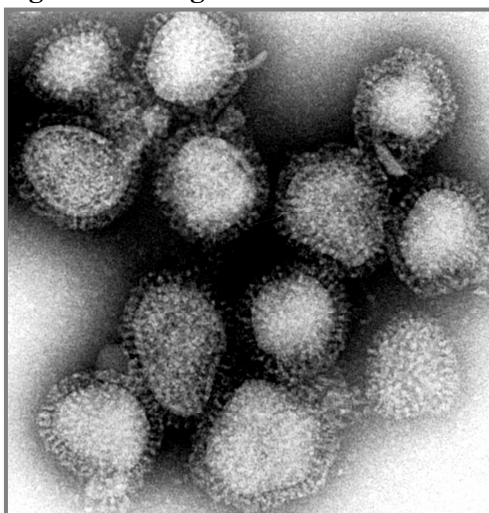
& Fouchier, 2000), enquanto o tipo C foi isolado também em suínos e cães (Wright et al., 2007).

O sistema de nomenclatura dos vírus Influenza inclui: o tipo do vírus (A, B, ou C); a espécie em que foi feito o isolamento (que é omitida no caso da espécie humana); a localização geográfica; o número da estirpe isolada e o ano do primeiro isolamento. No caso específico dos vírus Influenza de tipo A, é feita ainda a descrição do seu subtipo, por exemplo, A/chicken/Italy/322/2001 (H7N1) (Bouvier & Palese, 2008).

1.2.1 Estrutura da partícula viral

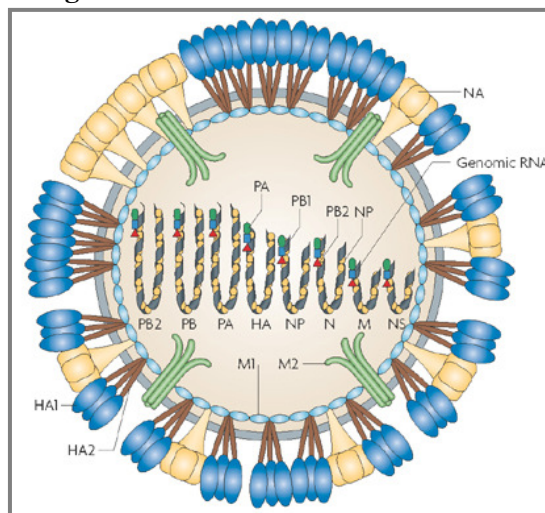
As partículas virais do género Influenza A são pleomórficas, podendo observar-se formas esféricas, com cerca de 80 a 120 nm de diâmetro, e formas filamentosas, com 200 a 300 nm de comprimento (fig.1) (Palese & Shaw, 2007). O genoma segmentado é formado por 8 cadeias simples de RNA com polaridade negativa. Cada segmento de RNA está associado a uma nucleoproteína (NP), originando oito nucleocápsides com simetria helicoidal. A nucleocápside está associada a um complexo RNA polimerase, constituído por três subunidades, PB1 (*polimerase basic 1*), PB2 (*polimerase basic 2*) e PA (*polimerase acid*), formando no seu conjunto o complexo ribonucleoproteico (RNP) (Bouvier & Palese, 2008).

Fig. 1. Morfologia do vírus Influenza A



Micrografia electrónica 70000x. Imagem gentilmente cedida por F. A. Murphy, School of Veterinary Medicine, U.C., Davis.

Fig. 2. Estrutura do virião Influenza A



Adaptado de Gunilla et al., 2008.

O viriã possui um envelope com origem na membrana plasmática da célula hospedeira, no qual se inserem numerosas espículas de hemaglutinina (HA) e de neuraminidase (NA), distribuídas numa proporção aproximada de 4 HA para 1 NA (fig. 2) (Bouvier & Palese, 2008). A hemaglutinina promove a entrada das partículas virais na célula hospedeira e, como

o seu nome indica, provoca aglutinação dos eritrócitos, induzindo no hospedeiro a formação de anticorpos inibidores da hemaglutinação, que neutralizam o poder infeccioso do vírus (Skehel & Wiley, 2000). A neuraminidase actua na libertação dos viriões recém-formados da célula hospedeira (Palese & Shaw, 2007). Os anticorpos formados contra a NA podem limitar a magnitude da infecção e a gravidade dos sinais clínicos, mas não previnem a infecção (Colman, 1994).

Uma terceira proteína, M2, integra a membrana numa proporção mais reduzida (fig.2). Esta proteína funciona como canal iónico, sobretudo de protões, regulando o pH no interior da partícula viral. Subjacente ao envelope lipídico existe a proteína da matriz M1, que confere estabilidade à partícula viral (Palese & Shaw, 2007). As proteínas M1 e NP estimulam a formação de anticorpos que fixam o complemento e as suas propriedades antigénicas permitem distinguir os vírus Influenza A, B e C (Palese & Shaw, 2007).

A proteína NEP (*Nuclear Export Protein*) está associada à matriz e, durante o ciclo replicativo, é responsável pelo transporte do complexo RNP do núcleo para o citoplasma da célula hospedeira (Bouvier & Palese, 2008).

1.2.2 Fases do ciclo replicativo

Adsorção aos receptores celulares

A hemaglutinina liga-se ao ácido siálico (SA) presente nos receptores de superfície da célula hospedeira (fig.3) (Skehel & Wiley, 2000). O ácido siálico está ligado a um resíduo de galactose por ligações do tipo SA α 2,3-Gal ou SA α 2,6-Gal, para as quais a hemaglutinina apresenta uma especificidade diferencial. A HA dos vírus que afectam as aves reconhece preferencialmente a ligação SA α 2,3-Gal, que predomina nas células do tracto intestinal destes animais. Os vírus humanos reconhecem preferencialmente as ligações SA α 2,6-Gal, que predominam no epitélio respiratório do Homem (Stevens et al., 2006).

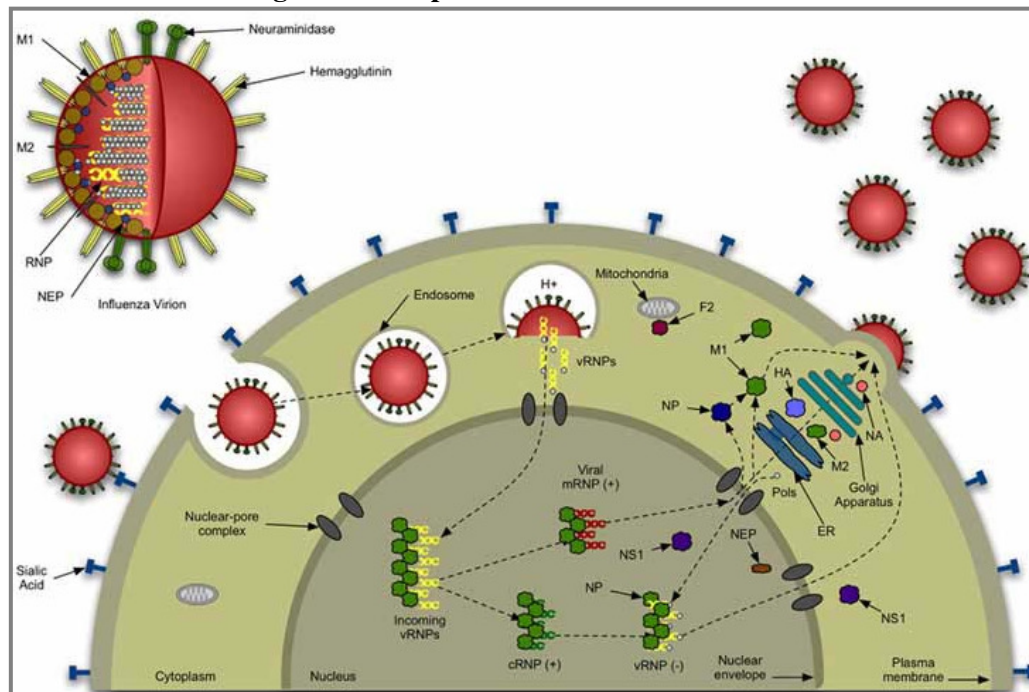
Internalização e descapsidação

Após a adsorção aos receptores celulares, o virião entra na célula hospedeira por um mecanismo de endocitose (fig. 3). A HA activa é formada por duas subunidades, HA₁ e HA₂, ligadas entre si por uma ponte dissulfureto (Skehel, Cross, Steinhauer & Wiley, 2001). O pH ácido do endossoma induz alterações conformacionais na molécula de HA, expondo um péptido de fusão na subunidade HA₂ que penetra na membrana do endossoma, promovendo a fusão deste com o envelope viral (Skehel et al., 2001; Skehel & Wiley, 2000). O fluxo de protões, através da proteína M2, para o interior do virião favorece a dissociação dos complexos RNP da matriz e a sua libertação no citoplasma (Bouvier & Palese, 2008).

Expressão das proteínas virais

Os complexos RNP são transportados activamente para o núcleo mediante sinais de localização nuclear (NLS) existentes nas ribonucleoproteínas, principalmente na NP. Numa primeira fase, o RNA viral é transcrito em RNA mensageiros (mRNA) que, depois de traduzidos, originam as proteínas estruturais e não estruturais do vírus, essencialmente NP e NS1 (proteína não estrutural 1). O aumento da concentração de NP livre favorece a síntese de RNA complementar (cRNA), utilizado como molde na síntese de RNA genómico viral (vRNA) que é encapsidado pela NP. Numa segunda fase, o vRNA recém-sintetizado serve de molde também à transcrição de mRNAs, ocorrendo a tradução essencialmente de HA, NA e M1 (Bouvier & Palese, 2008).

Fig. 3. Ciclo replicativo do vírus Influenza A



Adaptado de http://www.reactome.org/cgi-bin/eventbrowser?DB=test_reactome_17&ID=168254/.

Montagem das partículas virais

As proteínas HA, NA e M2 são processadas no retículo endoplasmático rugoso e no aparelho de Golgi, para depois serem transportadas para a superfície apical da célula, onde vão integrar a membrana plasmática (Bouvier & Palese, 2008). É à superfície da célula que proteases do hospedeiro clivam a HA precursora (HA₀) dando origem à HA activa (Stevens et al., 2006). As proteínas M1 e NEP medeiam o transporte das nucleocápsides recém-formadas para o citoplasma, onde estas se associam às proteínas HA, NA e M2 (Bouvier & Palese, 2008).

Libertação das partículas virais

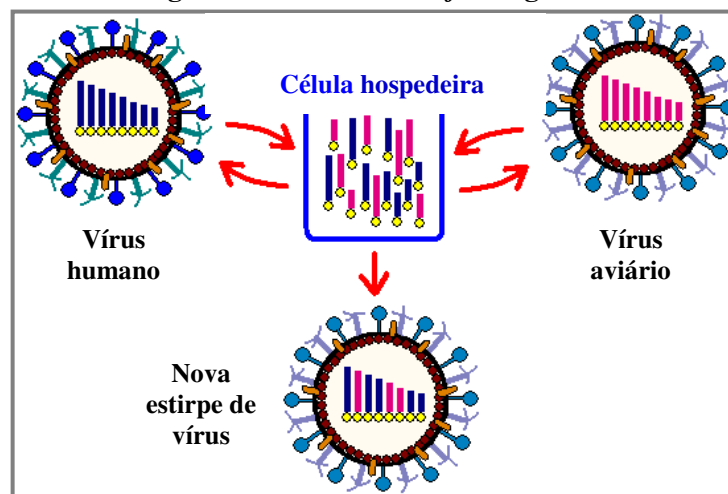
A acumulação de proteína M1 junto à membrana plasmática estimula a libertação das partículas virais recém-formadas pelo processo de gemulação (Bouvier & Palese, 2008). Este processo é concluído quando a enzima NA remove os resíduos de ácido siálico da superfície da célula e do envelope viral, evitando a agregação das partículas virais (Colman, 1994).

1.2.3 Evolução genética

Os vírus Influenza exibem uma elevada frequência de mutações que influenciam a virulência e a evolução do vírus, particularmente as que originam substituições de aminoácidos na HA e NA (Nelson et al., 2008). As sucessivas mutações na HA e NA, a par da pressão selectiva gerada pela resposta imunológica do hospedeiro, conduzem a mudanças graduais na estrutura antigénica destas proteínas, um mecanismo denominado de *drift* antigénico. Estas pequenas alterações são suficientes para o vírus se evadir ao sistema imunitário, possibilitando a sua sobrevivência na população (Barrera & Reyes-Terán, 2005).

O genoma segmentado do vírus Influenza A favorece a permuta de segmentos homólogos de RNA entre dois vírus geneticamente distintos, quando estes infectam a mesma célula (fig. 4). Este fenómeno está na origem de alterações genéticas bruscas que se traduzem no aparecimento de estirpes virais com características antigénicas novas, um processo denominado de *shift* antigénico. Desta forma, podem surgir novos subtipos de vírus que não são reconhecidos pelo sistema imunitário da grande maioria da população, podendo desencadear uma pandemia, caso se estabeleçam na população (Barrera & Reyes-Terán, 2005).

Fig. 4. Mecanismo de *shift* antigénico



Adaptado de <http://www.dr-bernhardpeter.de/Apotheke/Influenza/laune.htm/>.

1.2.4 Ecologia dos vírus influenza

Aves

As aves aquáticas migratórias, principalmente os anatídeos (patos, gansos e cisnes), as gaivotas e as limícolas, são o reservatório natural dos vírus Influenza A de baixa patogenicidade (LPAI – *Low Pathogenic Avian Influenza*) (Boyce, Sandrock, Kreuder-Johnson, Kelly & Cardona, 2009; Munster et al., 2007; Olsen et al., 2006). A transmissão do vírus no seio destas populações faz-se por via fecal-oral, essencialmente através da contaminação da água à superfície de lagos ou lagoas onde existe uma grande concentração de aves (Boyce et al., 2009; Olsen et al., 2006). Este mecanismo de transmissão é extremamente eficaz devido à intensa excreção do vírus nas fezes e à sua excelente estabilidade na água (Brown, Goekjian, Poulson, Valeika & Stallknecht, 2009). Os vírus LPAI são introduzidos nas populações de aves domésticas através do contacto directo com aves migratórias infectadas, ou indirectamente, por contaminação do alimento ou da água de bebida, ou por intermédio de vectores mecânicos ou fomites (Alexander, 2007). A disseminação do vírus intra e inter-explorações deve-se essencialmente ao movimento de pessoas, equipamentos e veículos (Alexander, 2007). Perus, galinhas, patos domésticos, gansos, codornizes, faisões e avestruzes são todos susceptíveis à infecção, sendo os perus a espécie mais sensível, seguidos pelas galinhas (Van Reeth, 2007). Alguns vírus (H5 e H7) de baixa patogenicidade podem ocasionalmente, por mutação, evoluir nas aves domésticas para vírus de alta patogenicidade (HPAI – *Highly Pathogenic Avian Influenza*) que originam surtos epidémicos de doença com elevada mortalidade (Banks et al., 2001). Os factores que determinam este tipo de mutação ainda não foram identificados. No entanto, assume-se que a circulação contínua dos vírus de baixa patogenicidade na população aumenta a probabilidade de emergência de vírus de alta patogenicidade (Alexander, 2007).

Suínos

Alguns vírus da gripe aviária de baixa patogenicidade, do subtipo H1 ou H3, têm sido isolados ocasionalmente nos suínos (Van Reeth, 2007). Há também evidência serológica de infecção pelos subtipos H4, H5 e H9 (Ninomiya, Takada, Okazaki, Shortridge & Kida, 2002). Até à data, estão apenas descritos casos esporádicos, não publicados, de suínos infectados no Sudeste Asiático com o vírus H5N1 de alta patogenicidade (Van Reeth, 2007). Em ensaios experimentais realizados em suínos inoculados por via intranasal ou através da ingestão de carcaças contaminadas, a replicação do vírus ficou restringida ao tracto respiratório e os sinais clínicos foram inaparentes ou moderados. A excreção viral foi reduzida, não sendo observada

transmissão entre os animais. Estes resultados indicam que o porco tem baixa susceptibilidade ao vírus H5N1 asiático (Lipatov et al., 2008; Choi et al., 2005). Apenas três subtipos de vírus Influenza A – H1N1, H3N2 e H1N2 – são endémicos nos suínos, sendo transmitidos entre os animais através de aerossóis e secreções respiratórias. A maior parte dos vírus Influenza A dos suínos são vírus recombinantes, contendo genes com origem em vírus do Homem, das aves e dos suínos (Van Reeth, 2007). O tracto respiratório superior destes animais possui receptores celulares para os vírus Influenza das aves e do Homem, SA α 2,3-Gal e SA α 2,6-Gal respectivamente, o que explica a sua susceptibilidade aos dois tipos de vírus. Por esta razão, sempre se pensou que os suínos funcionariam como hospedeiros intermediários na transmissão do vírus ao Homem, constituindo-se como um hospedeiro intermediário-chave na emergência de uma estirpe viral recombinante com potencial pandémico (Boyce et al., 2009; Capua & Alexander, 2008). No entanto, a recente descoberta de que o próprio Homem também possui receptores para vírus da gripe aviária no epitélio do tracto respiratório inferior (Shinya et al., 2006) e o aumento no número de casos de transmissão ao Homem devido ao contacto directo com aves infectadas, sugere que a recombinação genética entre os vírus das aves e os vírus humanos pode ocorrer também no próprio Homem (Van Reeth, 2007).

Equinos

Apenas dois subtipos de vírus Influenza A – H7N7 e H3N8 – circulam na população equina, formando duas linhagens filogenéticas distintas (Wright et al., 2007). No decurso de duas epidemias de gripe equina no Norte da China, em 1989 e 1990, isolou-se um vírus de subtipo H3N8 com características genéticas e antigénicas distintas dos vírus equinos e estreitamente relacionado com vírus H3N8 de origem aviária (Guo et al., 1992). Este vírus parece não ter conseguido estabelecer-se na população equina (Capua & Alexander, 2008).

Carnívoros

Desde 2003, o vírus H5N1 de alta patogenicidade tem causado a morte de alguns felídeos domésticos (Thiry et al., 2007) e selvagens (Keawcharoen et al., 2004; Thanawongnuwech et al., 2005). A infecção estará associada à ingestão de carcaças de aves infectadas. Ensaios experimentais mostraram que a inoculação de gatos com H5N1 resulta em doença e na excreção do vírus nas secreções respiratórias e nas fezes, o que sugere a possibilidade de transmissão entre felinos (Rimmelzwaan et al., 2006). Em 2004, foi isolado um vírus de subtipo H5N1 em várias amostras recolhidas durante a necrópsia de um cão na Tailândia. A infecção terá resultado da ingestão de uma carcaça de pato infectada (Songserm et al., 2006).

1.3 O Potencial Zoonótico da Gripe Aviária

No século XX verificaram-se três grandes pandemias de gripe que vitimaram milhões de pessoas em todo o mundo. A pandemia de 1918-1919, conhecida como “Gripe Espanhola”, teve início num campo militar Americano e foi responsável pela morte de 50 a 100 milhões de pessoas em todo o mundo de acordo com estimativas actuais, num dos eventos mais dramáticos na história da medicina (fig. 5) (Morens & Fauci, 2007). Na sua origem esteve

um vírus Influenza A de subtipo H1N1. A partir de amostras preservadas de tecido pulmonar das vítimas, foi possível isolar fragmentos de RNA para sequenciação (Taubenberger et al., 2005). As análises filogenéticas revelaram que este vírus emergiu não por recombinação genética entre vírus de origem humana e animal, mas sim através de um processo de adaptação de um vírus das aves ao Homem. O hospedeiro que funcionou como fonte do vírus e os fenómenos que levaram a essa adaptação permanecem ainda por identificar (Morens & Fauci, 2007). Cerca de quarenta anos mais tarde, em 1957, um vírus Influenza A de subtipo distinto, H2N2, desencadeou uma nova pandemia a partir do Sudoeste Asiático, que ficaria conhecida por “Gripe Asiática”. Apenas uma década mais tarde, em 1968, o vírus H2N2 em circulação na população foi substituído por um novo subtipo, H3N2, que iniciou uma terceira pandemia, a “Gripe de Hong Kong”. Ambos estes vírus foram considerados de baixa patogenicidade, mas vitimaram cerca de 1 milhão de pessoas em todo o mundo (Wit & Fouchier, 2008). Estudos filogenéticos revelaram que estes vírus emergiram através de fenómenos de recombinação genética entre vírus Influenza das aves e do Homem, para os quais não existia imunidade na população humana (Nelson et al., 2008).

Durante a última década, três subtipos de vírus Influenza aviários – H7, H9N2 e H5N1 – têm tido implicações zoonóticas (tabela 1). Dois destes subtipos, H9N2 e H5N1, são endémicos nas populações avícolas de vastas regiões do mundo, sendo que o vírus H5N1 asiático já provocou a morte de mais de duas centenas de pessoas (WHO, 2009a). Contudo, é difícil prever se algum destes três subtipos de vírus dará origem a um vírus pandémico (Capua &

Fig.5. A Gripe Espanhola



Hospital de campanha em Camp Funston, EUA. Imagem do arquivo do National Museum of Health and Medicine, EUA. <http://nmhm.washingtondc.museum>.

Alexander, 2008; Webster et al., 2007). Recentemente, verificou-se a emergência de uma nova estirpe de vírus Influenza A, de subtipo H1N1, na população humana. Os resultados da sequenciação demonstram que este nova estirpe viral emergiu a partir da recombinação genética entre os três subtipos de vírus Influenza A - H1N1, H1N2 e H3N2 - que circulam nas populações de suínos da Eurásia e América desde 1998, contendo genes de origem suína, humana e aviária (Garten et al., 2009; Trifonov, Khiabanian, Greenbaum & Rabadan, 2009). Os primeiros casos humanos foram confirmados na terceira semana de Abril de 2009 no México e nos Estados Unidos da América (WHO, 2009b). Desde então e até 6 de Julho de 2009 foram registados 94.512 casos confirmados, incluindo 429 mortes em 147 países/territórios (WHO, 2009d). O vírus afecta sobretudo crianças e jovens adultos, que podem apresentar desde sintomatologia respiratória ligeira a pneumonia grave ou fatal (Pan American Health Organization [PAHO], 2009). A emergência e rápida dispersão geográfica deste vírus, assim como a sua capacidade de transmissão eficiente entre os indivíduos na população, levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a elevar o nível de alerta pandémico, da Fase 3 para a Fase 4, em 27 de Abril de 2009 (WHO, 2009e). Dois dias depois, foi declarada a passagem à Fase 5, o que sugeria que uma nova pandemia de gripe estaria iminente (WHO, 2009c). No dia 11 de Junho de 2009, a OMS voltou a elevar o nível de alerta, com passagem à Fase 6, marcando o início de uma nova pandemia global (WHO, 2009f).

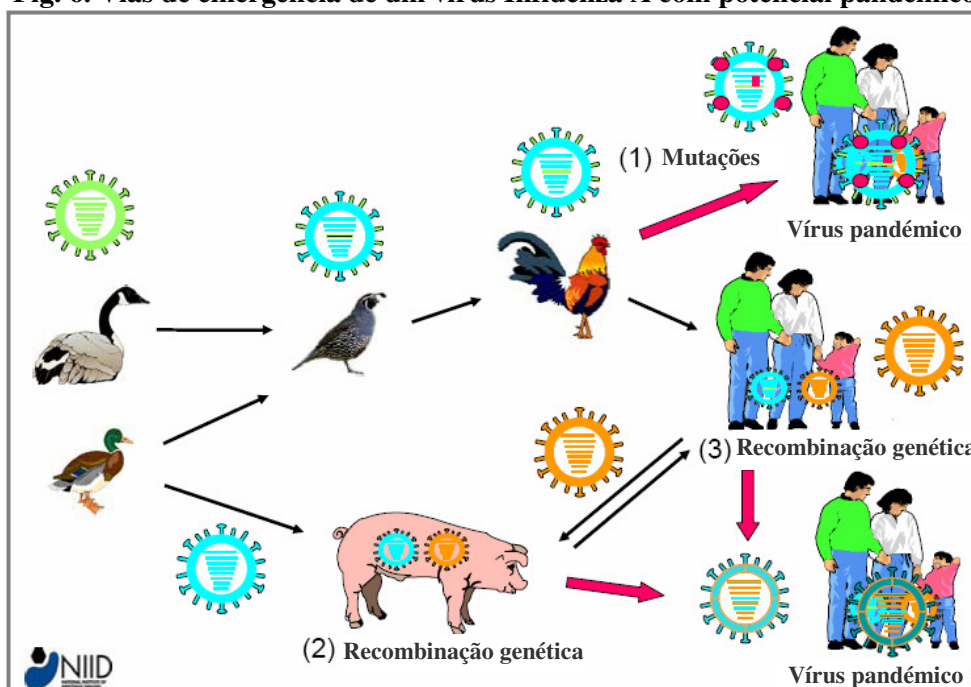
Os vírus Influenza humanos ligam-se preferencialmente aos receptores celulares do tipo SA α 2,6-Gal, que predominam no tracto respiratório superior humano (Stevens et al., 2006). Os vírus das aves exibem, regra geral, maior afinidade de ligação aos receptores do tipo SA α 2,3-Gal, predominantes no tracto intestinal das aves (Kuchipudi et al., 2009; Stevens et al., 2006), mas que também estão presentes no olho (Olofsson, Kumlin, Dimock & Arnberg, 2005) e no pulmão humano (Shinya et al., 2006). Um vírus Influenza capaz de se replicar eficazmente na conjuntiva poderá ter acesso ao tracto respiratório superior através do ducto nasolacrimonial. A adaptação do vírus aos receptores aí presentes, seja através de mutações, seja através da recombinação genética com um vírus humano, possibilitaria a transmissão eficaz do vírus entre os indivíduos (Olofsson et al., 2005). Por outro lado, Gambaryan et al. (2003) e Kuchipudi et al. (2009) demonstraram que receptores SA α 2,6-Gal, semelhantes aos receptores humanos, estão presentes no epitélio respiratório de aves domésticas (nomeadamente, nas galinhas), sugerindo que estas aves poderão potencialmente desempenhar o papel de hospedeiro intermediário na transmissão do vírus ao Homem (fig. 6).

Tabela 1. Casos de infecção humana por vírus da gripe aviária (1996 - 01/07/2009)

Ano	País	Subtipo	Patogenicidade	Nº Casos	Nº Mortes	Sintomatologia	Fonte
1996	Reino Unido	H7N7	Baixa	1	0	Conjuntivite	CDC
1997	China (Hong Kong)	H5N1	Alta	18	6	Respiratória	CDC
1999	China (Hong Kong)	H9N2	Baixa	2	0	Respiratória	CDC
2002	EUA (Virgínia)	H7N2	Baixa	1	0	Serologia positiva	CDC
2003	Holanda	H7N7	Alta	89	1	Resp./ Conjuntivite	CDC
	EUA (Nova Iorque)	H7N2	Baixa	1	0	Respiratória	CDC
	China (Hong Kong)	H9N2	Baixa	1	0	Respiratória	CDC
	China (Hong Kong)	H5N1	Alta	1	1	Respiratória	WHO
	Vietname	H5N1	Alta	3	3	Respiratória	WHO
2004	Canadá	H7N3	Baixa	2	0	Conjuntivite	CDC
	Tailândia	H5N1	Alta	17	12	Respiratória	WHO
	Vietname	H5N1	Alta	29	20	Respiratória	WHO
2005	Camboja	H5N1	Alta	4	4	Respiratória	WHO
	China	H5N1	Alta	8	5	Respiratória	WHO
	Indonésia	H5N1	Alta	20	13	Respiratória	WHO
	Tailândia	H5N1	Alta	5	2	Respiratória	WHO
	Vietname	H5N1	Alta	61	19	Respiratória	WHO
2006	Azerbaijão	H5N1	Alta	8	5	Respiratória	WHO
	Camboja	H5N1	Alta	2	2	Respiratória	WHO
	China (Hong Kong)	H9N2	Baixa	1	0	Respiratória	CDC
	China	H5N1	Alta	13	8	Respiratória	WHO
	Djibouti	H5N1	Alta	1	0	Respiratória	WHO
	Egipto	H5N1	Alta	18	10	Respiratória	WHO
	Indonésia	H5N1	Alta	55	45	Respiratória	WHO
	Iraque	H5N1	Alta	3	2	Respiratória	WHO
	Tailândia	H5N1	Alta	3	3	Respiratória	WHO
	Turquia	H5N1	Alta	12	4	Respiratória	WHO
2007	Reino Unido	H7N2	Baixa	4	0	Resp./ Conjuntivite	CDC
	Camboja	H5N1	Alta	1	1	Respiratória	WHO
	China	H5N1	Alta	5	3	Respiratória	WHO
	Egipto	H5N1	Alta	25	9	Respiratória	WHO
	Indonésia	H5N1	Alta	42	37	Respiratória	WHO
	Laos	H5N1	Alta	2	2	Respiratória	WHO
	Mianmar	H5N1	Alta	1	0	Respiratória	WHO
	Nigéria	H5N1	Alta	1	1	Respiratória	WHO
	Paquistão	H5N1	Alta	3	1	Respiratória	WHO
	Vietname	H5N1	Alta	8	5	Respiratória	WHO
2008	Bangladesh	H5N1	Alta	1	0	Respiratória	WHO
	Camboja	H5N1	Alta	1	0	Respiratória	WHO
	China	H5N1	Alta	4	4	Respiratória	WHO
	Egipto	H5N1	Alta	8	4	Respiratória	WHO
	Indonésia	H5N1	Alta	24	20	Respiratória	WHO
	Vietname	H5N1	Alta	6	5	Respiratória	WHO
2009	China	H5N1	Alta	7	4	Respiratória	WHO
	Egipto	H5N1	Alta	30	4	Respiratória	WHO
	Vietname	H5N1	Alta	4	4	Respiratória	WHO

Fontes: CDC – Centers for Disease Control and Prevention [<http://www.cdc.gov/flu/avian>]WHO – World Health Organization [http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza]

Fig. 6. Vias de emergência de um vírus Influenza A com potencial pandêmico



(1) Mutações sucessivas nos vírus em circulação nas aves domésticas alteram a especificidade de ligação aos receptores celulares, resultando na adaptação do vírus ao hospedeiro humano. (2) Os suínos também podem ser hospedeiros intermediários para a emergência de um vírus potencialmente pandêmico, através da recombinação genética entre vírus de origem aviária e de origem humana. (3) A introdução repetida de vírus aviários na população humana também aumenta a probabilidade de ocorrência de recombinação genética entre os dois tipos de vírus. Adaptado de Tashiro, 2008.

1.3.1 O subtipo H9N2

O vírus H9N2 é endêmico nas aves domésticas de muitos países da Eurásia (Capua & Alexander, 2008; Choi et al., 2004; Xu et al., 2007) e circula concomitantemente com o vírus Influenza humano de subtipo H3N2 em suínos domésticos na China (Cong et al., 2007; Peiris et al., 2001). Desde 1998, têm-se registado na Ásia vários casos humanos de infecção por H9N2 (tabela 1). A transmissão ocorre por contacto com aves infectadas e provoca doença respiratória ligeira, semelhante aos casos triviais de infecção por vírus de subtipo H1N1 ou H3N2 humanos (Butt et al., 2005; Lin et al., 2000), não existindo até à data provas definitivas da transmissão entre humanos (Wan et al., 2008). A caracterização genética dos vírus H9N2 isolados em humanos, aves e suínos domésticos na China no final da década de 90 revelou uma relação genética estreita com o vírus H5N1 que circulava nos mercados de aves de Hong Kong em 1997 (Cong et al., 2007; Lin et al., 2000; Guan, Shortridge, Krauss & Webster, 1999). Contudo, alguns destes isolados possuem, ao contrário dos vírus de subtipo H5N1, elevada afinidade de ligação aos receptores SA α 2,6-Gal do epitélio respiratório do Homem, favorecendo a transposição da barreira de espécie (Matrosovich et al., 2001).

A extensa circulação do vírus H9N2 em aves e suínos domésticos e a relação de proximidade do Homem com estas espécies na região Asiática aumenta a probabilidade da transmissão

interespecies (Peiris et al., 2001). Desta forma, cria-se oportunidade para a emergência, através de mutações sucessivas ou fenómenos de recombinação genética com vírus humanos, de uma variante do vírus H9N2 que poderá conservar a HA de subtipo H9 aviário, para a qual a população não possui imunidade prévia, mas que poderá possuir genes internos adaptados à replicação no hospedeiro humano, e transmitir-se de forma eficiente na população (Wan et al., 2008; Cong et al., 2007).

Fig. 7. Capoeira doméstica no Vietname



Convivência próxima do Homem com as aves e os suínos domésticos na região Asiática. Imagem cedida pela FAO.

1.3.2 Vírus pertencentes ao subtipo H7

Em 1996, um vírus Influenza de subtipo H7N7 foi isolado numa mulher inglesa com sinais clínicos de conjuntivite, proprietária de patos domésticos. Este seria o primeiro caso confirmado de infecção humana com um vírus Influenza de origem aviária (Capua & Alexander, 2008). Nos últimos anos, foram notificados vários focos de gripe por vírus de subtipo H7, de alta ou de baixa patogenicidade, em explorações avícolas da Europa e da América do Norte associados à transmissão directa do vírus aos seres humanos (tabela 1). Estudos serológicos realizados em 2002-2003 na população humana exposta aos focos de H7N3 ocorridos na Itália indicaram uma seroprevalência de 3,8% (Puzelli et al., 2005). Pouco tempo depois, em 2003, ocorria o maior número de casos humanos confirmados até hoje registado, associados a um foco de gripe causado pelo vírus H7N7 de alta patogenicidade nos Países Baixos, e que infectou 89 pessoas. Três destes casos envolveram familiares de pessoas infectadas, sugerindo a possibilidade de transmissão do vírus entre indivíduos. A maioria dos doentes apresentava sinais de conjuntivite; só oito pessoas exibiram sinais de doença respiratória; apenas uma pessoa morreu, em consequência de doença respiratória aguda (Koopmans et al., 2004). Entre 2002 e 2004, quatro casos foram confirmados na América do

Norte, pelos subtipos H7N2 e H7N3 (Tweed et al., 2004). Segundo um estudo recente, os vírus isolados em 2003 nos Países Baixos apresentavam ligação preferencial para os receptores SA α 2,3-Gal. Contudo, alguns dos vírus isolados na América do Norte, entre 2002 e 2004, apresentaram maior afinidade de ligação aos receptores SA α 2,6-Gal humanos (Belser et al., 2008).

1.3.3 O subtipo H5N1

Os primeiros casos humanos confirmados de infecção pelo vírus H5N1 de alta patogenicidade ocorreram em 1997, associados a uma epidemia nos mercados de aves vivas de Hong Kong. Novos casos surgiram a partir de 2003 até que, em 2006, se registaram os primeiros casos fora do Sudeste Asiático, nomeadamente na Turquia e no Egipto (Jong & Hien, 2006). Até 1 de Julho de 2009, foram confirmados 436 casos humanos, dos quais 262 tiveram desfecho fatal (tabela 1) (WHO, 2009a). Esta taxa de fatalidade de 60,1% denuncia o carácter extremamente patogénico da estirpe H5N1 asiática. Todos estes casos ocorreram sobretudo em populações rurais, e estão associados ao contacto directo com aves domésticas infectadas ou com superfícies contaminadas (Barrera & Reyes-Terán, 2005; Park & Glass, 2007). Apesar da elevada taxa de fatalidade, o número de casos registados é muito reduzido em relação aos milhões de pessoas que, diariamente, estão em contacto directo com aves domésticas e com os seus produtos, não havendo até à data provas irrefutáveis da transmissão entre indivíduos, o que sugere que o vírus H5N1 ainda não se adaptou ao hospedeiro humano e que a transmissão directa a partir das aves ainda é ineficiente (Webster et al., 2007; Wit & Fouchier, 2008). No entanto, se a epidemia actual nas aves domésticas não for controlada, continuarão a surgir oportunidades para a emergência, quer através de mutações sucessivas quer através da recombinação genética com vírus humanos, de uma variante viral capaz de se transmitir eficientemente na população, resultando numa nova pandemia de gripe humana (Capua & Alexander, 2008; Jong & Hien, 2006; Park & Glass, 2007).

Desde a sua emergência em 1997, a estirpe asiática H5N1 sofreu várias mutações e recombinações genéticas com outros vírus aviários, o que traduz a sua constante evolução e progressiva adaptação (Li et al., 2004). As estirpes em circulação são hoje mais resistentes no meio ambiente (Brown, Swayne, Cooper, Burns & Stallknecht, 2007) e cada vez mais patogénicas para mamíferos (Barrera & Reyes-Terán, 2005). O espectro de hospedeiros mais alargado inclui um amplo conjunto de aves domésticas e aves selvagens (Chen et al., 2006), felídeos (Thiry et al., 2007), canídeos (Songserm et al., 2006) e suínos (Choi et al., 2005; Van Reeth, 2007). Os patos, especialmente o pato-real (*Anas platyrhynchos*), apresentam actualmente uma excreção viral mais intensa e mais prolongada, essencialmente através do

tracto respiratório superior, sem manifestação de sinais clínicos (Keawcharoen et al., 2008; Sturm-Ramirez et al., 2005; Webster et al., 2007). Estes animais poderão, assim, assumir um papel importante na transmissão do vírus às aves domésticas, ou mesmo ao Homem, contribuindo para a perpetuação e para a disseminação do vírus H5N1 altamente patogénico (Barrera & Reyes-Terán, 2005).

1.4 A História da Gripe Aviária de Alta Patogenicidade

O primeiro foco confirmado de gripe aviária de alta patogenicidade (HPAI) ocorreu na Escócia em 1959. Desde então, mais de 28 focos foram registados em todo o mundo, metade dos quais ocorreram na última década (tabela 2) (Lupiani & Reddy, 2009). Calcula-se que, entre 1959 e 1998, 23 milhões de aves domésticas terão sido afectadas, e que, entre 1999 e 2004, este número ultrapassou os 200 milhões (Capua & Alexander, 2008). Pelo seu tremendo impacto económico, destacam-se os focos ocorridos na Itália em 1999 (H7N1), na Holanda em 2003 (H7N7), no Canadá em 2004 (H7N3) e a epidemia que emergiu em 1997 na Ásia (H5N1) e que a partir de 2003 se disseminou à Europa e à África (Lupiani & Reddy, 2009).

1.4.1 Itália (1999-2000)

Entre Março e Dezembro de 1999, foram identificados 199 focos de gripe aviária por H7N1 de baixa patogenicidade em explorações avícolas do norte de Itália. Em meados de Dezembro, foi isolado um vírus H7N1 de alta patogenicidade num bando de perus de carne que vitimou 100% do bando em 72 horas. O vírus altamente patogénico dispersou-se muito rapidamente, atingindo 413 explorações da região. Mais de 13 milhões de aves foram abatidas e destruídas, incluindo perus, galinhas, avestruzes, patos domésticos, faisões e codornizes (Capua, Mutinelli, Marangon & Alexander, 2000; Capua et al., 2002), o que acarretou custos na ordem dos 500 milhões de euros (Standing Committee on The Food Chain and Animal Health [SCFCAH], 2006). A re-emergência da estirpe de baixa patogenicidade em Agosto de 2000, atingindo 52 explorações, conduziu à realização de uma campanha de vacinação e a doença foi erradicada em meados de 2002 (Lupiani & Reddy, 2009).

1.4.2 Países Baixos (2003)

Entre Fevereiro e Março de 2003, uma estirpe de H7N7 altamente patogénico, afectou 225 bandos de galinhas poedeiras nos Países Baixos, tendo posteriormente se disseminado à Bélgica e à Alemanha (Stegeman et al., 2004). A epidemia foi controlada após o morticínio de 30 milhões de aves na Holanda, 2.7 milhões na Bélgica e 400.000 aves na Alemanha, com um

custo de cerca de 750 milhões de euros (Lupiani & Reddy, 2009). Foram confirmados 89 casos humanos, associados a contacto directo com aves infectadas (Koopmans et al., 2004).

Tabela 2. Principais focos de gripe aviária de alta patogenicidade desde 1959.

	Vírus	Subtipo	Espécies afectadas	Nº de aves destruídas
1	A/chicken/Scotland/59	H5N1	Galinhas	1 exploração pequena
2	A/tern/S. Africa/61	H5N3	Andorinhas	1.300
3	A/turkey/England/63	H7N3	Perus	29.000
4	A/turkey/Ontário/7732/66	H5N9	Perus	8.000
5	A/chicken/Victoria/76	H7N7	Galinhas e patos	58.000
6	A/chicken/Germany/79	H7N7	Galinhas e gansos	2 explorações
7	A/turkey/England/199/79	H7N7	Perus	> 9.000
8	A/chicken/Pennsylvania/1370/83	H5N2	Galinhas, perus	17.000.000
9	A/turkey/Ireland/1378/83	H5N8	Perus	307.000 (galinhas e perus, mas principalmente patos)
10	A/chicken/Victoria/85	H7N7	Galinhas	240.000
11	A/turkey/England/50-92/91	H5N1	Perus	8.000
12	A/chicken/Victoria/1/92	H7N3	Galinhas	18.000 (galinhas e patos)
13	A/chicken/Queensland/667-6/94	H7N3	Galinhas	22.000
14	A/chicken/Mexico/8623-607/94	H5N2	Galinhas	Milhões?
15	A/chicken/Pakistan/447/94	H7N3	Galinhas	> 6.000.000
16	A/chicken/NSW/97	H7N4	Galinhas	160.000
17	A/chicken/Hong Kong/97	H5N1	Galinhas, patos	1.500.000 (aves domésticas)
18	A/chicken/Italy/330/97	H5N2	Galinhas	8.000 (galinhas, perus, patos, gansos, codornizes, faisões e pombos)
19	A/turkey/Italy/99	H7N1	Perus	14.000.000 (galinhas, perus, patos, codornizes, faisões e avestruzes)
20	A/chicken/Chile/2002	H7N3	Galinhas	700.000 (galinhas e perus)
21	A/grey heron/Hong Kong/861.1/2002	H5N1	Aves selvagens	> 800.000 aves domésticas
22	A/chicken/Netherlands/2003	H7N7	Galinhas	> 34.000.000
23	A/chicken/Eurasia&Africa/2003-7	H5N1	Galinhas, patos	> 250.000.000
24	A/chicken/Texas/2004	H5N2	Galinhas	6.600
25	A/chicken/Canada/2004	H7N3	Galinhas	16.000.000
26	A/ostrich/S. Africa/2004	H5N2	Avestruzes	30.000
27	A/chicken/N. Korea/2005	H7N7	Galinhas	219.000
28	A/turkey/England/2007	H5N1	Perus	160.000

Adaptado de Lupiani & Reddy, 2009.

1.4.3 Canadá (2004)

Na Primavera de 2004, foi isolado um vírus de subtipo H7N3 numa exploração de galinhas reprodutoras no sudoeste do Canadá. Em apenas alguns dias, o vírus, inicialmente de baixa virulência, evoluiu para uma forma altamente patogénica. Apesar do reforço das medidas de biossegurança e do abate de todo o efectivo da exploração, o vírus disseminou-se a outras 42 explorações industriais e a 11 capoeiras domésticas. Mais de 17 milhões de aves pertencentes a 410 explorações industriais e a 553 capoeiras domésticas foram abatidas e destruídas,

resultando em perdas económicas de mais de 300 milhões de dólares (Bowes, 2007; Bowes et al., 2004). O vírus foi também isolado em 2 indivíduos que participaram das operações de abate das aves infectadas (Tweed et al., 2004).

1.4.4 Eurásia e África (2003 - presente)

O precursor do vírus H5N1 de alta patogenicidade foi detectado pela primeira vez em 1996 no Sul da China, após provocar a morte de alguns gansos domésticos (A/Goose/Guandong/1/96) (Xu, Subbarao, Cox & Guo, 1999). No ano seguinte, o vírus foi responsável por uma epidemia nas aves domésticas de explorações tradicionais e nos mercados de aves vivas de Hong Kong, transpôs a barreira de espécie e infectou 18 pessoas. A epidemia só foi controlada após o abate e a destruição da totalidade das aves domésticas do território, cerca de 1.5 milhões de aves (Jong & Hien, 2006). Entre o final de 2003 e o início de 2004, a estirpe H5N1 asiática causou uma série de novos focos, quase simultâneos, em vários países: Vietname, Tailândia, Coreia do Sul, Japão, China, Camboja, Laos, Malásia e Indonésia (Ligon, 2005; Webster, Peiris, Chen & Guan, 2006). Nessa altura, apenas o Japão, a Coreia do Sul e a Malásia conseguiram, por meio de detecção precoce e actuação rápida, controlar a epidemia. Nos restantes países da região, a doença tornou-se endémica, apesar do abate de mais de 140 milhões de aves domésticas (Webster et al., 2006a). A elevada densidade de aves domésticas, a predominância de explorações tradicionais, a extensa e complexa rede de comercialização de aves e dos seus produtos, incluindo mercados de aves vivas, aliados à fraca infraestrutura veterinária de alguns destes países, são condições que têm contribuído para a manutenção do vírus H5N1 no sudeste asiático (fig. 8) (Webster et al., 2006a).

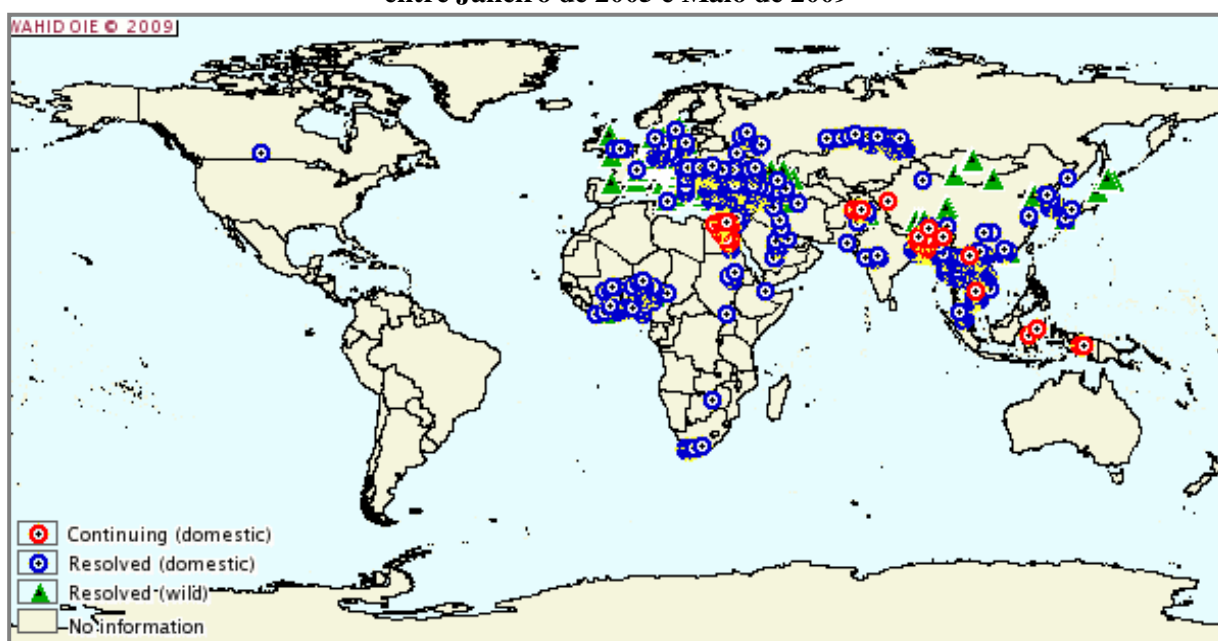
Fig. 8. Mercado de aves vivas em Hanoi, Vietname



Imagens gentilmente cedidas por Hans Wagner, FAO.

Até à Primavera de 2005, o vírus H5N1 altamente patogénico atingira essencialmente populações de aves domésticas, tendo sido detectado esporadicamente em aves selvagens mortas, normalmente em áreas próximas de explorações infectadas (Chen et al., 2005). No entanto, entre Abril e Maio de 2005, o H5N1 viria a ser responsável pela morte de mais de 6.000 aves selvagens na reserva natural do Lago Qinghai no oeste da China, um importante local de reprodução para as aves migratórias cujas rotas se estendem ao Sudeste Asiático, Índia, Sibéria, Austrália e Nova Zelândia (Chen et al., 2006). Em Julho e Agosto desse ano, o vírus foi isolado em aves domésticas e selvagens na Sibéria e no Kazaquistão e apenas em aves selvagens na Mongólia (Yee, Carpenter & Cardona, 2009), sugerindo que as aves migratórias tiveram um papel na disseminação do vírus H5N1 na região (Wang et al., 2008). A estirpe H5N1 asiática foi detectada pela primeira vez na Europa no Outono de 2005, em explorações avícolas da Turquia, Croácia e Roménia, e em África no início de 2006, onde foi reportada em aves domésticas do Egipto e da Nigéria (Yee et al., 2009).

Fig. 9. Focos de gripe aviária de alta patogenicidade em aves domésticas e selvagens, entre Janeiro de 2005 e Maio de 2009



Adaptado de OIE, obtido em http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_outbreak_map/.

Desde o início da actual epidemia em 2003 e até 20 de Maio de 2009, o vírus afectou 62 países/ territórios nos três continentes, Ásia, Europa e África, mantendo-se endémico no Bangladesh, na Indonésia, no Vietname e no Egipto (fig. 9). Mais de 250 milhões de aves domésticas morreram ou foram destruídas devido à doença (FAO, 2009a). Esta dispersão geográfica sem precedentes terá ocorrido através do comércio, legal ou ilegal, de aves infectadas e dos seus produtos (Van Borm et al., 2005; Yee et al., 2009) e, possivelmente,

através da actividade de aves migratórias infectadas (Keawcharoen et al., 2008; Yee et al., 2009). Actualmente, o H5N1 de alta patogenicidade tem sido isolado ocasionalmente em aves selvagens doentes ou mortas, o que sugere que o vírus não será endémico nas populações de aves selvagens da Eurásia e África, estando possivelmente limitado a um fenómeno de *spill-over* a partir de aves domésticas infectadas (Capua & Alexander, 2008; Krauss et al., 2007).

1.5 Patogenia e Sinais Clínicos

A maior parte dos vírus Influenza A isolados em aves selvagens é de baixa patogenicidade, sendo a infecção geralmente assintomática (Van Reeth, 2007). Esporadicamente, verificam-se casos de infecção com a estirpe H5N1 asiática, com morte de várias espécies de aves aquáticas migratórias (Chen et al., 2006). O aumento da virulência de algumas estirpes de H5N1 foi confirmado experimentalmente em algumas espécies de patos selvagens e também em patos domésticos (Sturm-Ramirez et al., 2005) que, regra geral, eram assintomáticos (Van Reeth, 2007).

Nas aves domésticas, a infecção por vírus de baixa patogenicidade pode ser inaparente ou com sintomatologia respiratória ligeira e/ ou quebra de postura. Os perus são a espécie mais sensível, podendo apresentar sintomatologia respiratória exuberante (fig. 10) (FAO, 2006).

Fig. 10. Sinais clínicos de gripe aviária de baixa patogenicidade nas aves domésticas



Perus infectados por vírus de baixa patogenicidade podem apresentar dispnéia, cianose (a) e sinusite (b), entre outros sinais. Obtido em <http://www.poultrymed.com/>.

Alguns vírus de baixa patogenicidade, nomeadamente estirpes H9N2 asiáticas, podem causar sinais clínicos mais exuberantes, com mortalidade considerável (Werner & Harder, 2006). Os vírus de alta patogenicidade produzem infecção sistémica em perus e galinhas, com prostração, edema da cabeça, corrimento ocular, dispnéia, sinusite, hemorragias subcutâneas,

especialmente cianose da cabeça e do barbilhão, diarreia e mortalidade que pode atingir 100% do bando em apenas 48 horas (fig. 11) (FAO, 2006; Werner & Harder, 2006).

Fig. 11. Sinais clínicos de gripe aviária de alta patogenicidade nas aves domésticas



Os sinais clínicos da gripe aviária de alta patogenicidade incluem prostração (a) e presença de hemorragias subcutâneas (b). Obtido em <http://www.poultrymed.com/>.

1.6 O Diagnóstico da Gripe Aviária

Os sinais clínicos exibidos pelas aves infectadas são inespecíficos e podem variar consoante a espécie e o estado imunitário do hospedeiro, a presença de infecções concomitantes, a estirpe do vírus e as condições ambientais. Assim, o diagnóstico definitivo de gripe aviária tem que ser feito por isolamento, identificação e caracterização do vírus envolvido, num Laboratório de Referência (World Organisation for Animal Health [OIE], 2008). No caso de Portugal, este laboratório é o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV).

1.6.1 Isolamento e identificação do vírus

O procedimento clássico proposto pela OIE (2008) inicia-se com a inoculação de ovos embrionados de galinha com 9-11 dias, a partir de amostras recolhidas por zaragatoa cloacal ou orofaríngea, no caso de aves vivas, ou amostras de fezes ou órgãos recolhidos durante a necrópsia. Após incubação dos ovos inoculados a uma temperatura de 35-37°C durante 4 a 7 dias, são realizados testes de hemaglutinação, que revelam a presença de um vírus com actividade hemaglutinante. A presença do vírus Influenza A é confirmada por um teste de agar-gel imunodifusão (AGID), que utiliza um antisoro específico para antígenos da nucleocápside e/ou da matriz. Posteriormente, é determinado o subtipo do vírus, através da utilização de antisoros monoespecíficos contra os antígenos de cada um dos 16 subtipos de hemaglutinina e 9 subtipos de neuraminidase conhecidos.

A avaliação da virulência da estirpe isolada é feita mediante a inoculação intravenosa de pintos com seis semanas de vida, que permite calcular um índice de patogenicidade intravenosa (IVPI – *Intravenous Pathogenicity Index*). Vírus que obtenham um IVPI superior a 1.2 são considerados vírus de alta patogenicidade (OIE, 2008).

Actualmente, a técnica clássica de inoculação em ovos embrionados tem sido substituída por técnicas moleculares, em particular por RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*). Apesar da maior rapidez de execução, esta técnica tem como limitante o custo elevado do equipamento e dos reagentes (Werner & Harder, 2006).

1.6.2 Serologia

Segundo as directivas da OIE e da FAO, o diagnóstico serológico da gripe aviária pode ser realizado através de três tipos de testes. A detecção de anticorpos contra antígenos conservados do vírus Influenza A, mais especificamente contra a nucleoproteína (NP) e a proteína da matriz (M1), pode ser feita através dos testes de agar-gel imunodifusão (AGID) ou ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay*) (OIE, 2008). O teste AGID é um teste de execução simples, muito específico, mas com sensibilidade limitada, podendo ser utilizado para a vigilância serológica de bandos de galinhas e perus (OIE, 2008). O teste ELISA é muito sensível, mas pouco específico, tendo a vantagem de poder ser utilizado em várias espécies. O teste de inibição da hemaglutinação (IH) é considerado o teste de referência (*gold standard*) para a detecção de anticorpos específicos contra a hemaglutinina à superfície da partícula viral (OIE, 2008).

1.7 O Controlo da Gripe Aviária

O controlo da gripe aviária é fundamental para limitar a emergência de vírus potencialmente pandémicos, para preservar a rentabilidade da avicultura industrial e para garantir a segurança alimentar e a subsistência de milhões de pequenos produtores nos países em vias de desenvolvimento (Capua & Marangon, 2007a; OIE, 2007). Para combater esta ameaça global, a comunidade veterinária internacional propôs uma estratégia de acção, identificando um conjunto de medidas coordenadas que podem ser aplicadas na prevenção, no controlo e, eventualmente, na erradicação da gripe aviária nas populações de aves domésticas. Estas medidas baseiam-se em cinco princípios fundamentais: (i) comunicação e formação; (ii) biossegurança; (iii) vigilância e identificação de focos; (iv) eliminação de aves infectadas; e (vi) aumento da resistência à infecção (FAO, 2006; FAO, 2008b; OIE, 2007).

A implementação das diferentes medidas de controlo deve adaptar-se às condições locais de forma a garantir a sua viabilidade e eficácia. Neste sentido, é importante considerar a situação eco-epidemiológica, as características de produção avícola (dimensão da população de aves domésticas, espécies produzidas, sistemas de produção, distribuição geográfica das explorações, etc.) e a estrutura geral e organizacional deste sector no país afectado, a capacidade de resposta da infraestrutura veterinária e a disponibilidade de recursos adequados para a implementação e a monitorização das medidas de controlo (Capua & Marangon, 2007b; Marangon, Cecchinato & Capua, 2008; OIE, 2007).

1.7.1 Comunicação e formação

A capacidade de resposta rápida é crucial no sucesso do controlo dos focos de gripe aviária. Para assegurar é fundamental a formação contínua e actualizada de todos os intervenientes na epidemiologia, vigilância, diagnóstico e notificação da doença; na implementação das medidas de controlo no terreno e na sensibilização para o uso de equipamento de protecção pessoal (OIE, 2007). De vital importância é também a sensibilização dos produtores e dos funcionários das explorações avícolas para a implementação das medidas de biossegurança, para o reconhecimento dos sintomas da doença e para a notificação de suspeita às autoridades competentes (Capua & Alexander, 2008).

Informar de forma adequada e transparente a população em geral é essencial para mitigar a quebra de confiança nos produtos avícolas e para evitar comportamentos de risco (Capua & Alexander, 2008).

1.7.2 Biossegurança

A biossegurança consiste na implementação de medidas que reduzem o risco de introdução (bioexclusão) e de disseminação (biocontenção) do vírus da gripe aviária, o que requer a adopção de um conjunto de atitudes e de comportamentos por parte de todos os intervenientes ao longo da cadeia de produção e de comercialização, incluindo intermediários e prestadores de serviços (FAO, 2008a). O planeamento da biossegurança deve ser adaptado ao risco existente e à realidade socio-económica de cada sistema de produção, nomeadamente a aceitabilidade social e cultural das medidas propostas e a sua viabilidade económica a longo prazo. A participação activa dos produtores, comerciantes e outros intervenientes na fase de planeamento é fundamental para assegurar a aplicação efectiva e a sustentabilidade das medidas recomendadas no terreno. A sensibilização para as razões que fundamentaram a implementação destas medidas e as vantagens que advirão da sua aplicação, associado em

alguns casos à criação de incentivos económicos e sociais, são factores de motivação para a alteração de comportamentos (FAO, 2008a).

A biossegurança a implementar nas explorações avícolas baseia-se essencialmente na criação de barreiras sanitárias, com o objectivo de limitar a oportunidade de entrada de animais infectados ou de material contaminado na exploração. Assim, as medidas que deverão fazer parte da rotina diária da exploração incluem, por exemplo (Yadav, 2006):

- Restrição da entrada de pessoas, animais e veículos na exploração;
- Controlo de pragas e utilização de redes anti-pássaros nas janelas;
- Limpeza e desinfecção eficazes de equipamentos e veículos de transporte à entrada e à saída da exploração;
- Utilização de vestuário e calçado próprio e exclusivo da exploração;
- Controlo das fontes de água e alimento e respectivo armazenamento em local protegido;
- Proceder à distribuição do alimento no interior dos pavilhões;
- Aplicação do princípio “tudo dentro, tudo fora” (“all in, all out”), ou seja, todas as aves entram e deixam a exploração em simultâneo;
- Desinfecção sistemática e vazio sanitário entre ciclos de produção;
- As camas, as penas e os restos de cascas de ovos devem ser encaminhados de forma controlada para sistemas de tratamento que garantam a sua descontaminação (compostagem, sistemas de biogás, deposição em aterro, incineração).

1.7.3 Vigilância e identificação de focos

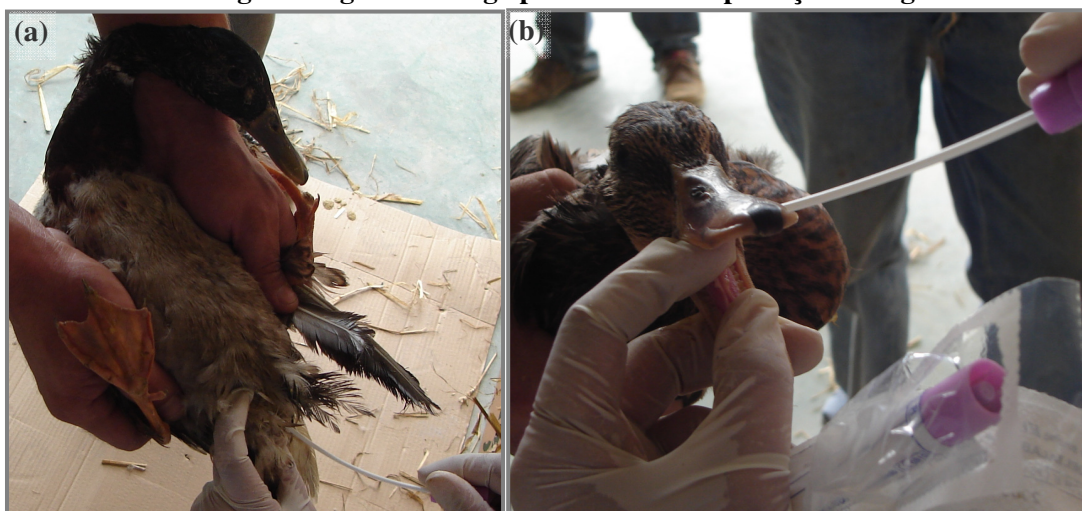
O estabelecimento de um sistema de vigilância eficaz permite detectar precocemente a circulação do vírus Influenza nas populações de aves domésticas e silvestres, definir factores de risco, estudar a evolução genética do vírus, caracterizar a epidemiologia da doença e avaliar a eficácia das medidas de controlo, em particular dos programas de vacinação (FAO, 2008b). Em Portugal, a vigilância activa das explorações de aves domésticas é realizada através da colheita de amostras de sangue no matadouro, representativas de explorações das várias espécies e das diversas Direcções de Serviços Veterinários Regionais (DSVR) do País, para realização de testes serológicos (ELISA ou IH). Exceptuam-se as explorações de produção de frangos de carne, que são rastreadas apenas em situações de risco. No caso das explorações cinegéticas, são realizadas zaragatoas cloacais e orofaríngeas na exploração para pesquisa do vírus (RT-PCR) (fig. 12). O momento de recolha de amostras coincide com a produção sazonal, no entanto, outros factores de risco poderão ser considerados a nível local e regional, pelo que pode ocorrer recolha de amostras em vários períodos (Direcção Geral de

Veterinária [DGV], 2009; Decisão 2007/268/CE; Decisão 2009/437/CE). Não obstante, em caso de observação ou registo de sinais clínicos de alerta, nomeadamente diminuição acentuada do consumo de água ou de alimento e mortalidade elevada inesperada, procede-se de imediato à recolha de amostras para pesquisa do vírus por RT-PCR (Decisão 2006/437/CE).

A Direcção Geral de Veterinária (DGV) é o organismo que a nível central é responsável pela elaboração, coordenação e acompanhamento do programa de vigilância, definindo os objectivos, as estratégias e a orientação das linhas de actuação e ouvindo todos os intervenientes nas acções a aplicar em cada região. Às DSVR compete não só controlar a execução das diferentes acções do programa na sua área, como ainda executar algumas dessas acções, e proceder à recepção e encaminhamento para o LNIV de amostras colhidas por outras entidades. Nas capoeiras domésticas, a colheita de amostras é da competência do Médico Veterinário Municipal, coadjuvado ou não pelas DSVR (DGV, 2009). A vigilância das populações de aves sinantrópicas e selvagens, supervisionada pela DGV e delegada nas DSVR, é feita pelas organizações de conservação da Natureza, equipas de anilhagem, caçadores, ornitologistas e brigadas especiais da Guarda Nacional Republicana e Polícia de Segurança Pública. Esta vigilância baseia-se na colheita de fezes ou de zaragatoas cloacais após captura e na recolha de cadáveres de aves encontradas mortas (DGV, 2009; Decisão 2007/268/CE; Decisão 2009/437/CE).

As DSVR e todas as outras entidades envolvidas na colheita de amostras enviam à DGV um relatório mensal sobre as acções efectuadas e colheitas realizadas. O LNIV envia à DGV os resultados laboratoriais à medida do processamento das análises.

Fig. 12. Vigilância da gripe aviária em explorações cinegéticas



A vigilância da gripe aviária nas explorações cinegéticas é feita através da colheita periódica de zaragatoas cloacais (a) e orofaríngeas (b) para pesquisa e isolamento do vírus.

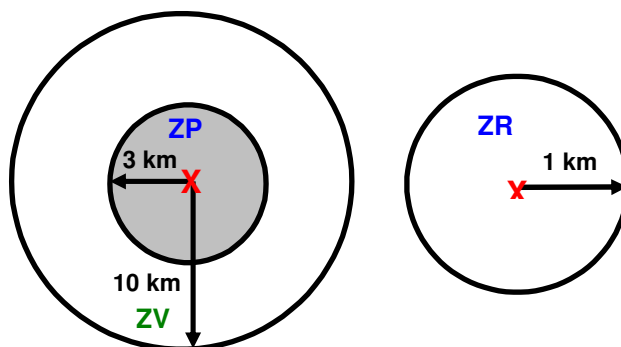
1.7.4 Activação do plano de contingência da gripe aviária

Pelo Decreto-Lei nº 110/2007 de 16 de Abril, Portugal transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva 2005/94/EC, que estabelece as medidas de controlo a aplicar em casos de suspeita e confirmação de focos de gripe aviária de alta patogenicidade (GAAP), ou de baixa patogenicidade (GABP) dos subtipos H5 e H7. Em caso de suspeita de foco, a Autoridade Sanitária Nacional (DGV através das DSVR) coloca de imediato a exploração suspeita sob vigilância oficial e procede à recolha e envio de amostras ao laboratório, a fim de confirmar ou excluir a presença de gripe aviária, e determina a realização de um inquérito epidemiológico. O inquérito epidemiológico deve considerar: (i) o período durante o qual o vírus possa ter estado presente na exploração; (ii) a eventual origem da infecção; (iii) a identificação das explorações de contacto; (iv) os movimentos de aves, pessoas ou outros mamíferos, veículos ou equipamentos, através dos quais o vírus se possa ter propagado. As medidas a aplicar na exploração colocada sob vigilância oficial compreendem: (i) o recenseamento de todas as aves existentes na exploração; (ii) o confinamento destas aves num edifício da exploração; (iii) a restrição dos movimentos das aves e dos seus produtos, de pessoas, equipamentos e veículos para dentro ou para fora da exploração; e (iv) o reforço das medidas de biossegurança. Após a confirmação de um foco de gripe aviária, a Autoridade Sanitária procede de imediato à activação do Plano de Contingência, com activação do Centro de Emergência Nacional da Gripe Aviária (CENEGA) e notificação do foco à Comissão Europeia e à OIE. A exploração infectada é sujeita à aplicação das medidas referidas atrás, para além das quais: (i) todas as aves da exploração devem ser sujeitas a occisão sob supervisão oficial (fig. 14); (ii) todos os cadáveres, ovos e substâncias ou resíduos susceptíveis de estarem contaminados devem ser eliminados de forma segura e também sob supervisão oficial; (iii) as aves já nascidas de ovos recolhidos na exploração no período de provável introdução do vírus da gripe aviária na exploração devem ser colocadas sob supervisão oficial; (iv) a carne e os ovos recolhidos durante este período devem ser identificados e eliminados; (v) após o despovoamento, as instalações, os equipamentos e os veículos deverão ser sujeitos a um processo de limpeza e desinfeção.

No caso de focos de GAAP, é estabelecida uma zona de protecção, com um raio de, pelo menos, 3km em torno do foco, e uma zona de vigilância, com um raio de, pelo menos, 10km em torno do foco (fig. 13). Na zona de protecção são aplicadas as seguintes medidas gerais: (i) recenseamento de todas as explorações existentes, com inspecção clínica das aves e recolha de amostras; (ii) reforço da vigilância; (iii) confinamento das aves no interior de pavilhões; (iv) proibição do movimento de aves ou dos seus produtos; (v) controlo do movimento de veículos; (vi) restrições ao movimento dos efluentes das explorações; (vii)

proibição de feiras, mercados ou outras concentrações de aves. Na zona de protecção são aplicadas as seguintes medidas: (i) recenseamento de todas as explorações; (ii) restrição do movimento das aves e dos seus produtos; (iii) controlo do movimento de veículos; (iv) proibição de feiras, mercados ou outras concentrações de aves. Todas estas medidas devem ser mantidas durante, pelo menos, 30 dias após a data de conclusão da limpeza e desinfeção da exploração infectada.

Fig. 13. Zonas de restrição estabelecidas em caso de foco de gripe aviária



Em caso de foco de GAAP são delimitadas duas zonas em torno do foco (esquema à esquerda na figura): a zona de protecção (ZP) e a zona de vigilância (ZV). No caso de GABP, é estabelecida uma zona de restrição (ZR) em torno da exploração infectada (esquema à direita na figura).

Quando se verifique um foco de GABP, é estabelecida uma zona de restrição num raio de, pelo menos, 1km em torno do foco (fig. 13). As medidas a aplicar na zona de restrições incluem essencialmente: (i) o recenseamento e a vigilância laboratorial das explorações comerciais; (ii) a restrição do movimento das aves e dos seus produtos; (iii) restrições ao movimento dos efluentes das explorações; (iv) o controlo do movimento de veículos; (iv) a proibição de feiras, mercados ou outras concentrações de aves. Estas medidas devem manter-se por, pelo menos 21 dias, após a data de conclusão da limpeza e desinfeção da exploração infectada, ou durante, pelo menos, 42 dias após a data de confirmação do foco e tendo em conta os resultados da vigilância na zona submetida a restrições.

A opção por uma estratégia de controlo da gripe aviária baseada exclusivamente na occisão das aves infectadas e potencialmente infectadas poderá traduzir-se em custos elevados e em perdas económicas para o sector público, para a indústria e, em última instância, para os consumidores (Capua & Marangon, 2007a). Esta estratégia pode ser eficaz no controlo e na erradicação da doença, se existir detecção precoce e resposta rápida e se complementada por outras medidas de controlo, como o aumento da biossegurança, restrição dos movimentos na região afectada, destruição adequada e segura das carcaças e materiais susceptíveis de estarem contaminados (ex.: camas, rações) e estabelecimento de um período de vazio sanitário após profunda limpeza e desinfeção da exploração (Capua & Marangon, 2007a; FAO, 2008b).

Porém, a experiência obtida com os focos ocorridos recentemente em Itália e nos Países Baixos mostra que a implementação deste conjunto de medidas pode ser ainda insuficiente para prevenir a extensa disseminação da infecção no caso de regiões com elevada densidade de explorações avícolas (Busani et al., 2009; Garske, Clarke & Ghani, 2007; Stegeman et al., 2004).

Fig. 14. Occisão de patos-reais infectados com um vírus LPAI



O abate é feito através da introdução das aves infectadas em *big bags* (sacos de grandes dimensões em tecido de polipropileno) com CO₂ no estado sólido, com posterior narcose e occisão dos animais devido à sublimação do CO₂. Imagens gentilmente cedidas pela Dra. Alexandra Fernandes (DIVRN).

1.7.5 Vacinação contra a gripe aviária

Embora as vacinas contra a gripe aviária estejam disponíveis há já vários anos, a maior parte dos países mostrava-se relutante em utilizá-las, essencialmente pelo receio da imposição de restrições às exportações e devido ao risco associado à utilização inadequada da vacinação, permitindo a circulação do vírus de campo nas aves vacinadas, o que resultaria na emergência de uma situação endémica (Capua & Marangon, 2007b). Não obstante, no início da última década, alguns países implementaram programas de vacinação como medida complementar da estratégia de controlo da gripe aviária, incluindo o México (H5N2 LPAI), Paquistão (H7N3 HPAI), Itália (H7N1 LPAI) e China (H5N1 HPAI) (Capua, 2007; Swayne, 2009). Todos estes países foram bem sucedidos na erradicação da infecção, à excepção do México onde se verificou a emergência de um *drift* antigénico que tornou o vírus H5N2 de baixa patogenicidade endémico no país (Lee, Senne & Suarez, 2004). A emergência e a extensa disseminação da estirpe H5N1 asiática nas populações de aves domésticas e selvagens levou a que vários outros países, nomeadamente Indonésia, Vietname, Índia, Egipto e Rússia, também recorressem à vacinação para sustentar a circulação do vírus, para além das medidas convencionais de morticínio e de destruição das carcaças (Swayne, 2009).

1.7.5.1 Vantagens e limitações da vacinação

A implementação de um programa de vacinação adequado, com selecção de vacinas apropriadas, conservadas e administradas de forma adequada, permite prevenir episódios clínicos da doença e a mortalidade associada; reduzir significativamente a excreção viral; e aumentar a resistência das aves vacinadas à infecção pelo vírus de campo (FAO, 2008b; Peyre, Fusheng, Desvaux & Roger, 2009; Van den Berg et al., 2008). No entanto, há um conjunto de potenciais limitantes que podem condicionar o sucesso da incorporação da vacinação na estratégia de controlo da gripe aviária. Uma das principais limitações é o elevado custo económico do plano de vacinação (Peyre et al., 2009). Como o valor comercial individual das aves domésticas, especialmente das galinhas, é extremamente baixo, os custos da vacina e da sua administração, e os custos da posterior monitorização das aves vacinadas são impossíveis de suportar em exclusivo pelos produtores (Van den Berg et al., 2008). Por outro lado, as restrições impostas ao movimento de aves vacinadas e dos seus produtos têm um impacto negativo nas trocas comerciais (SCFCAH, 2006). A somar aos factores económicos referidos, deve-se ter sempre presente que as vacinas existentes não garantem a prevenção da infecção (Maas, Tacken, Zoelen & Oei, 2009; Van der Goot, van Boven, Koch & de Jong, 2007). Além disso, a vacinação pode conduzir a um excesso de confiança nos produtores, que se poderão tornar menos rigorosos no que diz respeito à vigilância e à execução das medidas de biossegurança na exploração (Van den Berg et al., 2008). Deve-se também enfatizar que a utilização inadequada das vacinas pode eventualmente mascarar os sinais clínicos da infecção, sem contudo afectar a excreção viral, o que atrasa a detecção do vírus na população (Alexander, 2007). A ausência de vigilância pós-vacinal, associada ao incumprimento de medidas de biossegurança rigorosas, cria oportunidades para a circulação activa do vírus de campo na população vacinada (Beato et al., 2007; Peyre et al., 2009). Neste caso, a pressão de selecção exercida pela vacinação sobre a estirpe de campo favorece a ocorrência de *drifts* antigénicos, com perda de eficácia da vacina e tornando a infecção endémica, como se verificou com o vírus H5N2 de baixa patogenicidade no México, na Guatemala e em El Salvador (Lee et al., 2004).

A experiência adquirida até à data sugere que a vacinação deve ser integrada numa estratégia de controlo mais abrangente, que inclua: a eliminação de aves infectadas e potencialmente infectadas; a implementação de medidas estritas de biossegurança; o controlo do movimento de aves vacinadas e dos seus produtos; e o estabelecimento de uma rede de vigilância activa eficaz (Capua & Marangon, 2007b; Kelly, Hawkins, Sandrock & Boyce, 2008; OIE, 2007). O sistema de monitorização pós-vacinal é fundamental para: (i) avaliar a eficácia da vacinação, através da monitorização da resposta imunitária humoral (testes de IH); (ii) detectar a eventual

circulação do vírus de campo em bandos vacinados, através do exame clínico e da monitorização laboratorial (por serologia ou isolamento do vírus) de aves sentinela não vacinadas inseridas no bando vacinado ou pela vigilância serológica das aves vacinadas (testes ELISA com base no princípio DIVA); (iii) detectar a emergência de variantes antigénicas (FAO, 2008b; OIE, 2007).

Assim, o primeiro passo para desenhar um plano de vacinação deverá ser a realização de uma análise custo-benefício, que considere os custos (i) das vacinas e da sua distribuição; (ii) da implementação das medidas de biossegurança; (iii) da vigilância; e (iv) de todas as outras actividades necessárias. O impacto económico na produção, no comércio e, potencialmente, no comportamento do consumidor são também factores importantes a considerar (Capua, 2007; Marangon et al., 2008; OIE, 2007).

1.7.5.2 Indução da resposta imunitária

A vacinação estimula geralmente o desenvolvimento de uma resposta imunitária protectora, que pode dever-se à produção de anticorpos (imunidade humoral), à produção de linfócitos T sensibilizados (imunidade celular) ou a ambos (Beverley, 2001). A caracterização dos mecanismos imunitários envolvidos nesta resposta protectora é um elemento muito importante na avaliação da eficácia *in vivo* de uma determinada vacina (Van den Berg et al., 2008). No caso específico do vírus Influenza, a infecção induz uma resposta humoral com produção de anticorpos, a nível local e sistémico, e uma resposta celular com activação de células T citotóxicas (Tc), sendo ambas importantes na recuperação da infecção aguda e na resistência à re-infecção (Benton et al., 2001; Brown, Román & Swain, 2004).

Imunidade Humoral

A infecção pelo vírus Influenza A estimula no hospedeiro a produção sistémica de anticorpos específicos contra as glicoproteínas de superfície, HA e NA, e também contra duas proteínas internas, a proteína da matriz (M1) e a nucleoproteína (NP) (Van den Berg et al., 2008). Os anticorpos anti-HA neutralizam o poder infeccioso do vírus, conferindo protecção contra episódios clínicos da doença e contra a infecção por vírus homólogos (Skehel & Wiley, 2000). Os anticorpos formados contra a NA podem limitar a magnitude da infecção e a gravidade dos sintomas, mas não previnem a infecção (Colman, 1994).

A elevada frequência de mutações dos vírus Influenza, a par da pressão selectiva gerada pela resposta imunológica do hospedeiro, conduzem a alterações graduais na estrutura antigénica (*drift* antigénico) das glicoproteínas superficiais, HA e NA, permitindo ao vírus evadir-se ao sistema imunitário (Nash, 2001). Por conseguinte, o desenvolvimento de imunidade

protectora baseada na indução de anticorpos neutralizantes exige uma reformulação periódica das vacinas, de forma a reflectir as alterações antigénicas que ocorrem nas estirpes circulantes (Gerhard, Mozdzanowska & Zharikova, 2006). Alguns ensaios experimentais realizados em murganhos revelaram que vacinas de DNA com expressão de proteínas conservadas, nomeadamente a nucleoproteína (Epstein et al., 2002) e o domínio extracelular da proteína M2 (M2e) (De Filette et al., 2008; Tompkins et al., 2007), podem induzir uma resposta imunitária específica, quer de tipo humoral quer de tipo celular, que protege contra vírus heterólogos. No que diz respeito às aves domésticas, até à data ainda não foi determinado se os anticorpos sintetizados contra a proteína M2e são protectores (Van den Berg et al., 2008).

Imunidade Celular

A resposta imunitária celular não impede a infecção, mas reduz a gravidade dos sinais clínicos, diminuindo significativamente a morbilidade e a mortalidade (Flynn et al., 1998; Seo, Peiris & Webster, 2002). Vários estudos comprovaram que uma resposta celular específica dirigida contra proteínas internas conservadas do vírus Influenza desencadeia um efeito protector considerável para estirpes virais heterólogas (Benton et al., 2001; O'Neill, Krauss, Riberdy, Webster & Woodland, 2000; Seo et al., 2002).

Ensaio experimentais, envolvendo a inoculação de vírus H3N2 e H1N1 humanos em murganhos, demonstraram que a resposta a uma infecção primária é dominada por linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (Tc) que reconhecem determinantes antigénicos nas proteínas NP e PA (Belz, Xie & Doherty, 2001; Flynn et al., 1998), sendo detectados no epitélio respiratório infectado cerca de 5 a 7 dias após a infecção (Flynn et al., 1998; Lawrence, Ream & Braciale, 2005). A resposta a uma re-infecção é mais intensa e surge cerca de dois dias mais cedo, havendo um predomínio de linfócitos Tc específicos para a NP, que se mantêm na população de células de memória (Flynn et al., 1998). Os linfócitos T helper CD4⁺ (Th) promovem a activação de linfócitos Tc específicos e estimulam a diferenciação dos linfócitos B através da produção das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Contudo, pouco se conhece sobre a possibilidade de envolvimento directo dos linfócitos Th no controlo da infecção (Brown et al., 2004; Thomas, Keating, Hulse-Post & Doherty, 2006). Ensaio realizados com galinhas sugerem que, na ausência de anticorpos neutralizantes, a resposta celular mediada por linfócitos Tc produz um efeito protector contra o vírus H5N1 de alta patogenicidade, com prevenção dos sinais clínicos e redução da excreção viral (Seo et al., 2002; Seo & Webster, 2001). As células Tc de memória no pulmão desempenham um papel fundamental no estabelecimento da imunidade protectora (Seo et al., 2002).

1.7.5.3 Tipos de vacinas disponíveis no mercado

Potência, estabilidade à temperatura ambiente, segurança, administração única, custo reduzido, assim como possibilidade de diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados, estão entre as características da vacina ideal. Contudo, até à data nenhuma das vacinas disponíveis no mercado contra a gripe aviária satisfaz a totalidade destes requisitos (Peyre et al., 2009; Van den Berg et al., 2008). As vacinas existentes são de dois tipos: vacinas convencionais inactivadas e vacinas recombinantes de vectores (FAO, 2009b).

Vacinas inactivadas

A produção das vacinas inactivadas convencionais baseia-se na cultura de estirpes de campo em ovos embrionados de galinha com 9-11 dias, seguida de colheita a partir do líquido córion-alantóide e de inactivação química com substâncias como a formalina ou a β -propiolactona (OIE, 2008). O adjuvante utilizado é geralmente uma emulsão de água em óleo mineral. Para além de induzir uma reacção inflamatória no local da administração com activação de células apresentadoras de antigénios, o óleo mineral possibilita que o antigénio seja libertado de forma gradual, estimulando continuamente uma resposta imunitária específica (Van den Berg et al., 2008).

As vacinas inactivadas são classificadas em homólogas, se a estirpe vacinal tem o mesmo subtipo do vírus de campo, ou heterólogas, se a estirpe vacinal pertence ao mesmo subtipo de HA, mas possui diferente subtipo de NA (Capua & Marangon, 2007a). O principal inconveniente da utilização de vacinas homólogas é a impossibilidade de distinção entre aves vacinadas e aves naturalmente infectadas, interferindo por isso na vigilância serológica do vírus (Peyre et al., 2009; Van den Berg et al., 2008). Contudo, dispomos actualmente de várias estratégias para demonstrar que o vírus de campo não se encontra em circulação nas populações vacinadas (DIVA - *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*). Uma das estratégias mais utilizadas baseia-se na manutenção de aves sentinela não vacinadas, marcadas e facilmente identificáveis, no bando vacinado. Estas aves são monitorizadas regularmente, através de testes serológicos ou por pesquisa e isolamento do vírus, permitindo uma detecção precoce em caso de introdução do vírus na exploração (Capua & Marangon, 2007a). A utilização de vacinas heterólogas permite, mediante a utilização de testes ELISA específicos, a detecção de anticorpos específicos contra a NA que actuam como marcadores da infecção natural (Capua & Marangon, 2007a).

Recentemente, alguns investigadores desenvolveram novas estratégias DIVA baseadas na detecção de anticorpos específicos dirigidos contra a proteína NS1 (Tumpey, Alvarez, Swayne & Suarez, 2005) e contra o domínio extracelular da proteína M2 (M2e) (Lambrecht,

Steensels, Van Borm, Meulemans & van den Berg, 2007). A proteína NS1 não está associada à partícula viral, sendo produzida apenas durante a replicação do vírus Influenza A na célula infectada. Logo, apenas os animais infectados com o vírus de campo apresentam anticorpos contra esta proteína (Tumpey et al., 2005). A proteína M2 é uma proteína integral da membrana do virião com maior expressão nas células infectadas (Lambrecht et al., 2007).

Diversos ensaios experimentais revelaram que as vacinas inativadas comercializadas actualmente previnem a morbidade e a mortalidade e reduzem significativamente, ou inibem mesmo, a excreção viral e a transmissão secundária em aves vacinadas, após infecção com um vírus de campo (Beato et al., 2007; Bos, Nielen, Koch, Stegeman & De Jong, 2008; Bouma et al., 2009; Bublot et al., 2007a; Ellis et al., 2004; Middleton et al., 2007; Poetri et al., 2009; Steensels et al., 2007; Tian et al., 2005; Van der Goot et al., 2008; Van der Goot, Koch, de Jong & van Boven, 2005).

O desenvolvimento da tecnologia de genética reversa aplicada aos vírus Influenza, tornou possível produzir, de forma relativamente célere, vírus recombinantes inativados que possuem as combinações de HA e NA desejadas e os 6 genes internos de uma estirpe viral adaptada à replicação em culturas de células, geralmente a estirpe A/PR/8/34. As estirpes vacinais assim obtidas possuem propriedades antigénicas semelhantes às estirpes de campo, mas com redução da virulência (Swayne, 2009; WHO, 2005). Vários estudos comprovaram que as vacinas recombinantes de subtipo H5N3 (Middleton et al., 2007; Webster et al., 2006b; Veits et al., 2008) e de subtipo H5N1 (Kim et al., 2008; Tian et al., 2005), conferem também um elevado grau de protecção contra a infecção pelo vírus H5N1 de alta patogenicidade.

Vacinas recombinantes de vectores

O princípio de produção destas vacinas consiste na inserção de genes que codificam a hemaglutinina (HA) e/ ou a neuraminidase (NA) num vírus vivo capaz de infectar as aves domésticas. Os vírus da Varíola Aviária (Bublot et al., 2007b; Qiao et al., 2009; Steensels et al., 2009; 2007), da Doença de Newcastle (Veits et al., 2008; 2006) ou da Laringotraqueíte Infecciosa (Pavlova, Veits, Keil, Mettenleiter & Fuchs, 2009) foram utilizados na produção destas vacinas. Porém, neste momento apenas três vacinas recombinantes – duas contra a Varíola Aviária e uma contra a Doença de Newcastle – estão a ser comercializadas, mas nenhuma delas está autorizada na Europa (FAO, 2009b). A maioria dos estudos realizados até à data realçam que a utilização destas vacinas está associada a um conjunto amplo de vantagens, como por exemplo permitirem a utilização da estratégia DIVA, através do recurso a testes ELISA ou AGID para detecção de anticorpos específicos contra a NP, proteína M ou a proteína NS1, produzidos apenas em caso de infecção natural (Pavlova et al., 2009; Qiao et

al., 2009; Swayne, 2009; Veits et al., 2006). Outra das suas vantagens consiste no facto de que uma única administração induz imunidade protectora contra episódios clínicos da doença e reduz significativamente a excreção viral, em caso de infecção com o vírus de campo (Bublot et al., 2007b; Pavlova et al., 2009; Qiao et al., 2009; Veits et al., 2008; 2006). Em alguns casos, este efeito protector observa-se logo a partir da primeira semana após a vacinação (Qiao et al., 2009; Veits et al., 2008; 2006). Por fim, a utilização do vírus da Doença de Newcastle ou do vírus da Laringotraqueíte Infecciosa possibilita uma estratégia de vacinação em massa (via aerossóis ou através da água de bebida), o que é extremamente vantajoso do ponto de vista operacional e económico, relativamente à vacinação parentérica exigida pela vacina recombinante da Varíola Aviária e pelas vacinas inactivadas (Pavlova et al., 2009; Veits et al., 2006). A principal limitação ao uso das vacinas de vectores reside nas aves previamente expostas ou anteriormente vacinadas com o vírus vector. De facto, Swayne, Beck & Kinney (2000) observaram que, nestes casos, a protecção induzida pela vacina recombinante é apenas parcial.

1.7.5.4 Avaliação da Eficácia Vacinal

O *gold standard* para a avaliação da eficácia de uma vacina consiste na utilização de um modelo experimental de infecção com um vírus influenza A de baixa ou alta patogenicidade. O grau de protecção conferido pela vacina pode ser quantificado através de alguns parâmetros, nomeadamente, a morbilidade e a mortalidade, o nível de excreção viral respiratória e intestinal e a ocorrência de transmissão secundária a aves susceptíveis de contacto, após inoculação das aves vacinadas com um vírus de campo (Swayne, 2009). Este tipo de ensaio experimental decorre em ambiente controlado e utiliza geralmente animais SPF (*Specific Pathogen Free*) (Bouma et al., 2009; Steensels et al., 2009; Veits et al., 2008). No entanto, alguns ensaios têm sido conduzidos no campo, mas sob condições controladas (Tian et al., 2005). O ensaio experimental poderá fornecer ao observador informação acerca dos factores limitantes relacionados, por um lado, com a própria vacina, nomeadamente com o serótipo da estirpe vacinal e o grau de protecção induzida, ou por outro lado, com as aves vacinadas, como a persistência dos anticorpos maternos, estados de imunossupressão, estatuto sanitário ou mesmo factores genéticos (Peyre et al., 2009).

Alternativamente, a avaliação da eficácia vacinal pode ser feita de forma indirecta com base na monitorização da resposta serológica das aves vacinadas. Neste caso, é estabelecida uma correlação entre o título de anticorpos protectores presentes no soro, determinado pelo teste da inibição da hemaglutinação (IH), e o nível de protecção verificado num cenário de infecção natural (Ellis et al., 2004; Van den Berg et al., 2008).

1.7.5.5 Implementação de planos de vacinação na União Europeia

A Directiva 2005/94/CE da Comissão Europeia estabelece um conjunto de medidas relacionadas com a vigilância, detecção precoce e o controlo da gripe aviária, prevendo a utilização de vacinação de emergência (vacinação “em anel”) e de vacinação preventiva nas explorações avícolas em risco e nos novos bandos de explorações sujeitas a morticínio. A implementação destes planos de vacinação deve incluir o controlo do movimento das aves vacinadas e dos seus produtos e o estabelecimento de um sistema de monitorização do cenário epidemiológico e da eficácia da vacinação.

A vacinação de emergência é uma medida de curto prazo, devendo ser aplicada aquando da introdução do vírus numa região/país, com risco de rápida e extensa dispersão geográfica da infecção/doença ou ameaça de espécies protegidas ou pertencentes a colecções zoológicas e a reservas naturais (Marangon et al., 2008). Nestes casos, a Comunidade co-financia 100% do custo da vacina e 50% das despesas inerentes à campanha de vacinação (Decisão 2006/53/CE). A eficácia do plano de vacinação de emergência depende da capacidade de limitar precocemente a disseminação da infecção, através da rápida disponibilização de vacinas adequadas e da sua administração correcta, associada à aplicação imediata de medidas de controlo no terreno e à montagem de um sistema de vigilância e de monitorização adequado (Marangon et al., 2008).

A vacinação preventiva é uma medida de longa duração adoptada em cenários de elevado risco de introdução e posterior disseminação do vírus, para maximizar as medidas de biossegurança. A vacinação deverá aumentar a resistência das aves à infecção e, sobretudo, reduzir a excreção viral em caso de exposição ao vírus, diminuindo o número de focos secundários e minimizando os prejuízos económicos e o impacto negativo no bem-estar animal. A vigilância activa dos bandos vacinados é fundamental para a detecção precoce e para uma resposta rápida em caso de foco (Capua, 2007; Marangon et al., 2008). Estes planos não são co-financiados pela Comunidade Europeia.

A experiência Italiana

A Itália foi, em 2000, o primeiro Estado-Membro a incluir a vacinação de emergência no programa de controlo da gripe aviária (Decisão 2000/721/CE). Cerca de 15 milhões de aves, essencialmente perus de carne e galinhas poedeiras, foram vacinadas com uma vacina inactivada heteróloga de subtipo H7N3 (estirpe A/Chicken/Pakistan/95), de forma a limitar a re-emergência do vírus H7N1 de baixa patogenicidade na região norte do país (Capua et al., 2002). O sistema de vigilância pós-vacinal baseou-se na monitorização serológica das aves vacinadas, utilizando um teste específico para detecção de anticorpos anti-N1 (DIVA), de

aves sentinela não vacinadas e também na monitorização de aves de outras explorações localizadas dentro e fora da área de vacinação (Capua & Marangon, 2007b). A utilização de testes DIVA com resultados negativos foi considerada como uma garantia adicional para os Estados-Membros, autorizando-se pela primeira vez a realização de trocas intracomunitárias de carne e ovos provenientes de aves vacinadas (Decisão 2001/847/CE).

Entre 2002 e 2004, um novo plano de vacinação foi aprovado, desta vez para complementar as medidas de controlo dos focos causados por um vírus de subtipo H7N3 de baixa patogenicidade que atingiu a mesma região, que tem a maior densidade de explorações avícolas do país (Decisão 2002/975/CE). A vacinação, com uma vacina inactivada de subtipo H7N1 (estirpe A/Chicken/Italy/1999), permitiu circunscrever e limitar a disseminação da infecção, observando-se apenas focos esporádicos de baixa patogenicidade na região (Capua & Marangon, 2007b).

Com base nas experiências anteriores, as Autoridades Competentes Italianas executaram um plano de vacinação preventiva em explorações de perus e de galinhas poedeiras da região de risco, utilizando uma vacina inactivada bivalente H5/H7 (Decisão 2004/666/CE). O objectivo deste programa vacinal, mantido até 2006, consistia na indução de um nível basal de imunidade protectora nas populações em risco. A vacinação não impediu a ocorrência de novos focos de gripe aviária de baixa patogenicidade (subtipos H7N1 e H5N2) em explorações de perus vacinados, contudo a disseminação da infecção foi limitada e os focos foram controlados eficazmente num período de tempo inferior e com uma considerável redução dos prejuízos económicos (Capua & Marangon, 2007b). O custo anual do programa de vacinação, incluindo despesas com vacinação e vigilância, foi calculado em 0,10€ a 0,15€ por ave vacinada (SCFCAH, 2006).

Em 2007, observou-se um novo aumento do número de focos de gripe aviária de baixa patogenicidade (16 de subtipo H7 e 1 de subtipo H5N2) em explorações domésticas e industriais no norte da Itália (Busani, 2009). Uma vez mais, a vacinação de emergência, com uma vacina inactivada heteróloga monovalente (H7N1) e com uma vacina bivalente (H7N4 e H5N9), foi utilizada como uma ferramenta adicional na estratégia de controlo (Decisão 2007/638/CE).

A experiência Francesa

Em 2006, a França procedeu à vacinação de cerca de 50.000 patos e alguns milhares de gansos contra a gripe aviária de alta patogenicidade, subtipo H5N1, pertencentes a explorações localizadas em regiões com elevado risco de exposição ao vírus (Decisão 2006/148/CE). A vacinação, realizada em alternativa ao confinamento das aves, foi

complementada por acções de vigilância – clínica, serológica e virológica – nas áreas de vacinação, e por medidas de restrição ao movimento das aves vacinadas (Capua, 2007). O governo Francês suportou a totalidade dos custos económicos, estimados em 0,80€ por ave vacinada (SCFCAH, 2006).

A experiência dos Países Baixos

A vacinação preventiva contra o risco de introdução do vírus H5N1 de alta patogenicidade a partir do reservatório selvagem foi também implementada nos Países Baixos (Decisão 2006/147/CE). O plano de vacinação iniciou-se em 2006 e prolonga-se até 31 de Julho de 2009 (Decisão 2007/590/CE). A vacinação está a ser realizada em regime voluntário em capoeiras domésticas e em explorações com modo de produção biológico, em alternativa ao confinamento das aves. Os serviços veterinários oficiais fazem a identificação e o registo de todas as aves vacinadas e procedem à monitorização serológica da infecção nas explorações vacinadas (Capua, 2007). A utilização de aves sentinela não vacinadas, o reforço do nível de biossegurança nas explorações e a restrição aos movimentos são outras medidas adicionais do plano. Os custos económicos decorrentes da avaliação da eficácia vacinal estão a cargo do Estado Holandês, sendo as restantes despesas assumidas pelos produtores (SCFCAH, 2006).

A experiência Portuguesa

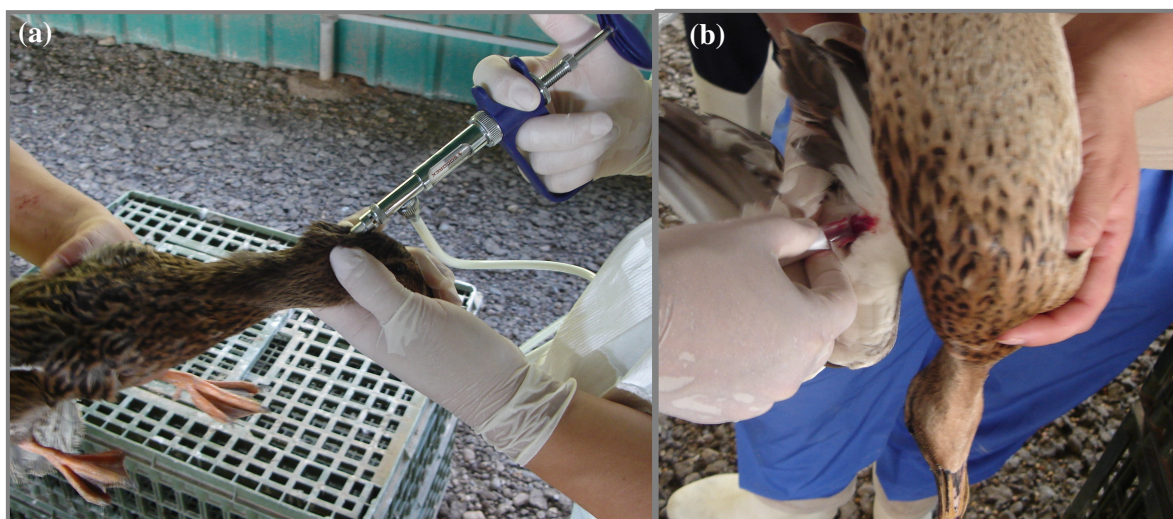
Na sequência de um foco de gripe aviária de baixa patogenicidade, subtipo H5N2, ocorrido numa exploração cinegética de patos-reais em Setembro de 2007, Portugal desencadeou um plano de vacinação de emergência do novo núcleo de patos reprodutores que vieram repovoar esta exploração (fig. 15a) (Decisão 2008/285/CE). As aves foram vacinadas com uma vacina inactivada bivalente, contendo os subtipos H5N9 e H7N1, com o objectivo de aumentar a resistência das aves à infecção e de reduzir a excreção e a disseminação viral em caso de re-introdução do vírus na exploração.

Seis meses após a primeira campanha de vacinação, os serviços veterinários oficiais implementaram um plano de vacinação preventiva na exploração (Decisão 2008/838/CE). Os resultados preliminares da vacinação de emergência, assim como as especificidades do tipo de exploração, a sua localização numa área de risco elevado, o historial sanitário da exploração e o elevado valor genético e comercial das aves produzidas contribuíram para a aprovação deste novo plano vacinal. Neste caso, utilizou-se uma vacina inactivada bivalente contendo os subtipos H5N6 e H7N7, por uma questão meramente de disponibilidade da vacina.

Ambas as campanhas de vacinação foram acompanhadas por um reforço da biossegurança na exploração vacinada e nas explorações envolventes, com restrição do movimento das aves

vacinadas e dos seus produtos e pelo estabelecimento de um sistema de vigilância activa na exploração vacinada e nas explorações envolventes. Os serviços veterinários oficiais asseguram que: (1) os patos reprodutores vacinados permanecem devidamente confinados num pavilhão da exploração até ao fim do seu período reprodutivo, após o que estas aves serão abatidas de modo humano e as suas carcaças serão eliminadas por enterramento na própria exploração; (2) os ovos para incubação originários dos patos vacinados apenas são transportados para outra incubadora em Portugal e que não são expedidos para outros Estados-Membros; (3) os descendentes dos patos vacinados poderão deixar a exploração para reconstituição de efectivos cinegéticos após os quatro meses de idade, desde que os resultados das medidas de vigilância e monitorização sejam favoráveis (Decisão 2008/285/CE; Decisão 2008/838/CE).

Fig. 15. Vacinação de patos-reais e colheita de sangue para serologia



(a) A vacina inactivada é administrada por via subcutânea, na região posterior da cabeça. (b) Algumas semanas depois procede-se à colheita de sangue, por picada na asa, para monitorização da resposta vacinal através da titulação de anticorpos presentes no soro (IH).

A vigilância pós-vacinal baseou-se na vigilância – clínica e virológica – de aves sentinelas não vacinadas (com colheita periódica de zaragatoas orofaríngeas e cloacais para isolamento do vírus por RT-PCR) e na monitorização serológica da infecção nas aves vacinadas (utilizando testes ELISA segundo o princípio DIVA) (fig. 15b) e também nas explorações localizadas na área envolvente (por recolha de amostras de sangue nos lotes enviados para o matadouro, para a realização de testes ELISA). A resposta imunitária humoral das aves vacinadas foi aferida por testes de IH.

Os planos de vacinação implementados em Portugal, nomeadamente a caracterização da população vacinada e a descrição do protocolo vacinal, assim como a monitorização da resposta imunitária humoral das aves vacinadas são abordados no próximo capítulo.

A experiência Alemã

A Decisão 2006/705/CE da Comissão Europeia aprova um plano de vacinação preventiva para três explorações industriais Alemãs (patos domésticos, gansos e galinhas poedeiras), no âmbito de um projecto de investigação para avaliação da eficácia protectora da vacinação contra a gripe aviária de alta patogenicidade em condições de campo. Numa primeira fase do estudo, as aves são vacinadas com uma vacina inactivada monovalente de subtipo H5N2, salvaguardando todas as medidas de biossegurança e de vigilância previstas na Directiva 2005/94/CE e na Decisão 2006/705/CE da Comissão Europeia. Posteriormente, as aves vacinadas são transferidas para instalações de alta biossegurança e inoculadas com um vírus H5N1 de alta patogenicidade. Os resultados preliminares do estudo, que foi conduzido entre 2006 e 2008, sugerem que a vacina induz uma resposta imunitária protectora nas galinhas, tendo se verificado, após a infecção com o vírus de campo em galinhas e gansos, a ocorrência de transmissão do vírus a aves de contacto não vacinadas (Rudolf et al., 2007).

Vacinação de aves em jardins zoológicos

Actualmente, a vacinação preventiva de aves mantidas em jardins zoológicos está aprovada em 17 países da União Europeia, entre os quais Portugal (Decisão 2007/598/CE). Os resultados obtidos indicam que a vacinação induz uma resposta imunitária humoral significativa na maioria das espécies após duas administrações de vacina (Bertelsen, Klausen, Holm, Grøndahl & Jørgensen, 2007; Philippa et al., 2007). No entanto, não existem conclusões definitivas relativamente à real eficácia protectora da vacinação nestas aves (Furger, Hoop, Steinmetz, Eulenberger & Hatt, 2008).

CAPÍTULO 2. VACINAÇÃO DE PATOS-REAIS (*Anas platyrhynchos*) CONTRA A GRIPE AVIÁRIA EM PORTUGAL

2.1 Introdução

Na última década, a estirpe asiática H5N1 de alta patogenicidade disseminou-se rapidamente pela Ásia, Europa e África, resultando na destruição de mais de 250 milhões de aves domésticas (FAO, 2009a; Capua & Alexander, 2008) e na morte de 262 pessoas em 436 casos confirmados (até 1/07/09), representando uma séria ameaça à Saúde Pública (WHO, 2009a). A vigilância epidemiológica, o cumprimento das medidas de biossegurança, a eliminação das aves infectadas e a restrição ao movimento dos animais constituem a primeira linha de defesa contra o vírus, e têm sido aplicadas com sucesso no controlo de focos de alta patogenicidade na Europa (Kelly et al., 2008; Swayne, 2009). A vacinação é uma medida complementar importante quer na prevenção quer no controlo de focos de gripe aviária altamente patogénica em regiões com risco elevado de introdução do vírus (Capua & Marangon, 2007b). Os patos, especialmente o pato-real (*Anas platyrhynchos*), desempenham um papel importante na amplificação e na disseminação do vírus (Keawcharoen et al., 2008; Sturm-Ramirez et al., 2005; Webster et al., 2007). Por conseguinte, a disponibilização de vacinas que sejam eficazes nesta espécie em condições de campo constitui-se como uma ferramenta importante no controlo do vírus (Middleton et al., 2007). Estudos recentes comprovam que algumas vacinas inactivadas (Beato et al., 2007; Kim et al., 2008; Middleton et al. 2007; Steensels et al., 2007; Tian et al., 2005; Van der Goot et al., 2008; Webster et al., 2006b), assim como as vacinas recombinantes de vectores (Steensels et al., 2009; 2007), previnem a morbilidade e a mortalidade e reduzem significativamente a excreção viral e a transmissão secundária em patos domésticos vacinados, após a infecção experimental com um vírus de subtipo H5N1 de alta patogenicidade.

No decurso das acções de monitorização do Plano de Vigilância da Gripe Aviária foram detectados em Portugal, entre 12 de Setembro e 31 de Dezembro de 2007, quatro focos de gripe aviária de baixa patogenicidade, subtipo H5 não N1, procedendo-se de imediato à activação do Plano de Contingência com abate e destruição de todo o efectivo das explorações infectadas. O primeiro foco, de subtipo H5N2, ocorreu numa exploração cinegética de patos-reais (*Anas platyrhynchos*), localizada na área de intervenção da Divisão de Intervenção Veterinária do Ribatejo Norte (DIVRN), da Direcção de Serviços Veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo (DSVRLVT). Segundo a legislação comunitária e nacional, procedeu-se à occisão do efectivo da exploração (81.961 patos), seguida de uma extensa operação de limpeza, desinfectação e vazio sanitário das instalações da exploração. Além disso, todas as

lagoas, naturais e artificiais, foram drenadas e, após a concretização desta medida, foi espalhado óxido de cálcio (cal viva) no fundo das lagoas.

As especificidades do tipo de exploração, a sua localização numa área de risco elevado, o historial sanitário da exploração e o elevado valor genético e comercial dos patos produzidos levaram à aprovação junto da Comissão Europeia de um plano de vacinação de emergência do novo núcleo de patos reprodutores que vieram repovoar esta exploração (Decisão 2008/285/CE). A vacinação de emergência, implementada a 15 de Fevereiro de 2008 como um complemento das medidas de biossegurança em vigor, teve como objectivo a redução da susceptibilidade dos patos ao vírus e a redução da excreção e disseminação do vírus a outras explorações em caso de nova introdução do vírus na exploração. Os bons resultados do plano de vacinação de emergência, aliados à manutenção dos factores referidos atrás, conduziram à instituição de um plano de vacinação preventiva na exploração (Decisão 2008/838/CE), com início a 17 de Setembro de 2008. O sistema de vigilância implementado na exploração vacinada baseou-se na vigilância clínica, na monitorização serológica de aves vacinadas e na vigilância virológica de aves sentinela e de aves mortas.

O objectivo do presente estudo consiste na monitorização da resposta imunitária humoral induzida pela vacinação, de forma a avaliar se as aves vacinadas se encontram acima do limiar considerado de protecção e a calcular a taxa de imunização atingida.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Caracterização da população vacinada

Estudo 1

A população vacinada é constituída por 1.611 patos reprodutores com 10 meses de idade. Todos os animais vacinados estão confinados num pavilhão da exploração e isolados até ao fim da sua vida reprodutiva.

Estudo 2

A população vacinada é heterogénea, sendo composta por dois grupos distintos de animais:

- o grupo A, formado por 1.579 patos reprodutores com 16 meses de idade, já vacinados contra a gripe aviária no semestre anterior (Estudo 1), e submetidos nesta fase a uma revacinação semestral;
- o grupo B, que inclui 2.487 patos reprodutores com 6 meses de idade, que serão vacinados pela primeira vez (descendentes das aves do grupo A, seleccionados para aumentar o efectivo reprodutor).

2.2.2 Protocolo vacinal

Estudo 1

Utilizou-se uma vacina inactivada bivalente, com as estirpes A/chicken/Italy/22A/1998 (H5N9) e A/chicken/Italy/1067/1999 (H7N1), que induz, de acordo com o teste de potência, um título mínimo de 8 log₂ para cada subtipo (Poulvac® i-AI, Fort Doge Animal Health Holland). As aves foram submetidas a uma primovacinação, com uma dose de 0,5 ml administrada por via subcutânea na zona do pescoço, seguida de um reforço, com a mesma dose, três semanas depois, como recomendado pelo fabricante.

Estudo 2

Utilizou-se uma vacina inactivada bivalente, com as estirpes A/duck/Potsdam/2243/84 (H5N6) e A/duck/Potsdam/15/80 (H7N7), que induz, de acordo com o teste de potência, um título mínimo de 6 log₂ para cada subtipo (Nobilis Influenza®, Intervet International, Boxmeer). As aves do grupo A foram vacinadas com uma dose única de 1 ml, por via subcutânea na região do pescoço, enquanto as aves do grupo B foram submetidas a uma primovacinação, com uma dose de 0,5 ml, seguida de um reforço com a mesma dose, duas semanas depois como recomendado pelo fabricante.

2.2.3 Amostragem

Estudo 1

Da população vacinada foram seleccionados aleatoriamente 30 patos, dos quais se colheram 30 amostras de sangue para titulação de anticorpos pós-vacinais. Esta operação repetiu-se por quatro vezes, num período aproximado de 7 meses, salvaguardando que se estudavam sempre aves diferentes. O tamanho da amostra foi calculado para o nível de confiança de 95%, assumindo uma eficácia vacinal esperada de 85%.

Estudo 2

Da população vacinada foram seleccionados aleatoriamente 20 patos, dos quais se colheram 20 amostras de sangue para titulação de anticorpos pós-vacinais. Esta operação repetiu-se por seis vezes, num período aproximado de 6 meses, salvaguardando que se estudavam sempre aves diferentes. O tamanho da amostra foi calculado para o nível de confiança de 95%, assumindo uma eficácia vacinal esperada de 85%.

2.2.4 Titulação dos anticorpos pós-vacinais

A titulação de anticorpos anti-H5 e anti-H7 no soro das aves amostradas foi feita por meio de testes de inibição da hemaglutinação (IH), realizados no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), conforme a Decisão da Comissão nº 2006/437/CE. Considerou-se que títulos iguais ou superiores a 16 UIHA (Unidades Inibidoras da Hemaglutinação) são protectores e reflectem uma resposta adequada à vacinação, de acordo com o Manual de Diagnóstico da OIE.

2.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram introduzidos, validados e posteriormente analisados numa base de dados construída na folha de cálculo Microsoft® Office Excel 2003. Para facilitar a análise e a interpretação das titulações de anticorpos os resultados são expressos numa escala logarítmica de base dois (\log_2).

As titulações realizadas no âmbito do estudo 2 (vacinação preventiva), às 10 e às 14 semanas após a vacinação, não foram consideradas na análise estatística, por falha no registo da identificação das aves amostradas. A análise estatística foi realizada nos programas informáticos SPSS® versão 15.0 e Win Episcope® versão 2.0.

2.3 Resultados

A vacina foi bem tolerada por todas as aves, não tendo sido observada qualquer reacção adversa em ambos os estudos. A taxa de mortalidade observada entre Fevereiro de 2008 e Dezembro de 2008 variou de 0% a 0,87%, de acordo com os dados fornecidos pelo Médico Veterinário responsável pela exploração. A mortalidade observada esteve atribuída essencialmente ao registo de temperaturas elevadas e ao aumento da agressividade entre as aves durante a época de reprodução.

2.3.1 Estudo 1: Resposta humoral à vacinação de emergência

A resposta humoral dirigida contra o subtipo H5 caracterizou-se por uma taxa de imunização¹ elevada, que se manteve acima dos 80% até pelo menos as 29 semanas após a primovacinação (IC_{95} : 79,5- 100%) (tabela 3). O título médio de anticorpos nos animais seropositivos teve o

¹ A taxa de imunização refere-se à percentagem de patos vacinados que apresentam um título igual ou superior a $4 \log_2$.

seu valor máximo às 3 semanas após a primovacinação (IC_{95} : 7,0- 8,0 \log_2), diminuindo depois progressivamente. No entanto, este título manteve-se acima do limiar de protecção (4 \log_2) por pelo menos 26 semanas após o reforço (IC_{95} : 4,7- 5,7 \log_2).

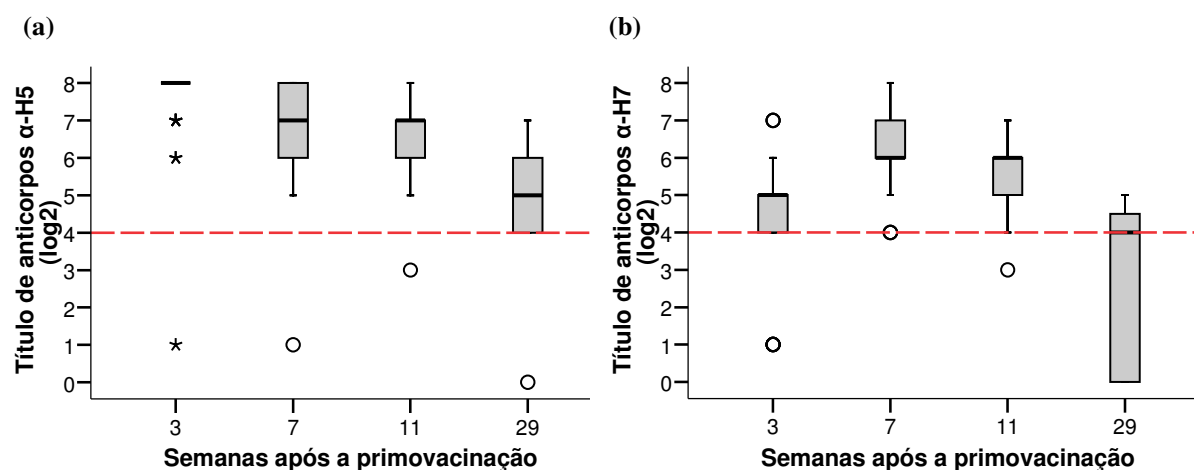
A resposta humoral ao subtipo H7 exibiu um maior grau de variabilidade (fig.16b). O título médio é superior ao limiar de protecção a partir das 7 semanas após a primovacinação (tendo em conta que IC_{95} : 5,7- 6,4 \log_2 na tabela 3) e até às 29 semanas após a primovacinação (IC_{95} : 4,1- 4,8 \log_2). A taxa de imunização foi inferior àquela atingida para o subtipo H5, com um limite mínimo do intervalo de confiança de 95% que varia entre 39,5% e 87,3%.

Tabela 3. Resposta humoral à vacinação de emergência. Titulação de anticorpos específicos para H5 e para H7 por inibição de hemaglutinação (n=30).

Semanas após a primovacinação	Tx. Imunização H5 (IC_{95}) ^a	Título médio α -H5 (IC_{95}) ^b	Tx. Imunização H7 (IC_{95}) ^a	Título médio α -H7 (IC_{95}) ^c
3	96,6 (83,7 - 100)	7,5 (7,0 - 8,0)	79,3 (66,4 - 92,2)	4,4 (3,7 - 5,1)
7	96,7 (84,0 - 100)	7,0 (6,4 - 7,5)	100,0 (87,3 - 100)	6,0 (5,7 - 6,4)
11	95,7 (81,2 - 100)	6,5 (5,6 - 7,1)	95,7 (81,2 - 100)	5,74 (5,3 - 6,2)
29	95,0 (79,5 - 100)	5,2 (4,7 - 5,7)	55,0 (39,5 - 70,6)	4,5 (4,1 - 4,8)

^aIntervalo de confiança de 95%, considerando o erro associado à amostra; ^b, ^cTítulo médio de anticorpos específicos para H5 ou H7 calculado com base apenas nos animais seropositivos e expresso em \log_2 .

Fig. 16 (a-b). Titulação de anticorpos (a) α -H5 e (b) α -H7 por inibição da hemaglutinação, após a vacinação de emergência.



A linha vermelha tracejada assinala o título considerado protector (4 \log_2). As caixas indicam a mediana, o intervalo inter-quartil e a amplitude dos títulos obtidos. Os círculos representam os valores atípicos (*outliers*), e os asteriscos representam os valores extremos (*extreme*).

2.3.2 Estudo 2: Resposta humoral à vacinação preventiva

A revacinação semestral dos patos pertencentes ao grupo A induziu uma resposta humoral menos intensa e menos duradoura relativamente à sua primeira vacinação (Estudo 1), tanto para o subtipo H5 como para o subtipo H7 (fig. 17a,b), não se podendo afirmar que exista protecção humoral para além das 6 semanas após a primovacinação (tabela 4).

Tabela 4. Resposta humoral à vacinação preventiva nos patos do grupo A. Titulação de anticorpos específicos para H5 e para H7 por inibição de hemaglutinação (n=20).

Semanas após a primovacinação	Tx. Imunização H5 (IC ₉₅) ^a	Título médio α -H5 (IC ₉₅) ^b	Tx. Imunização H7 (IC ₉₅) ^a	Título médio α -H7 (IC ₉₅) ^c
6	100,0 (73,6 - 100)	6,3 (5,4 - 7,2)	71,4 (45,0 - 97,8)	6,2 (4,8 - 7,6)
18	90,0 (67,9 - 100)	5,1 (3,8 - 6,4)	20,0 (0 - 42,1)	2,0 (0,8 - 3,2)
22	40,0 (17,9 - 62,1)	3,8 (2,9 - 4,7)	50,0 (27,9 - 72,1)	3,5 (3,1 - 3,9)

^aIntervalo de confiança de 95%, considerando o erro associado à amostra; ^b, ^cTítulo médio de anticorpos específicos para H5 ou H7 calculado com base apenas nos animais seropositivos e expresso em log₂.

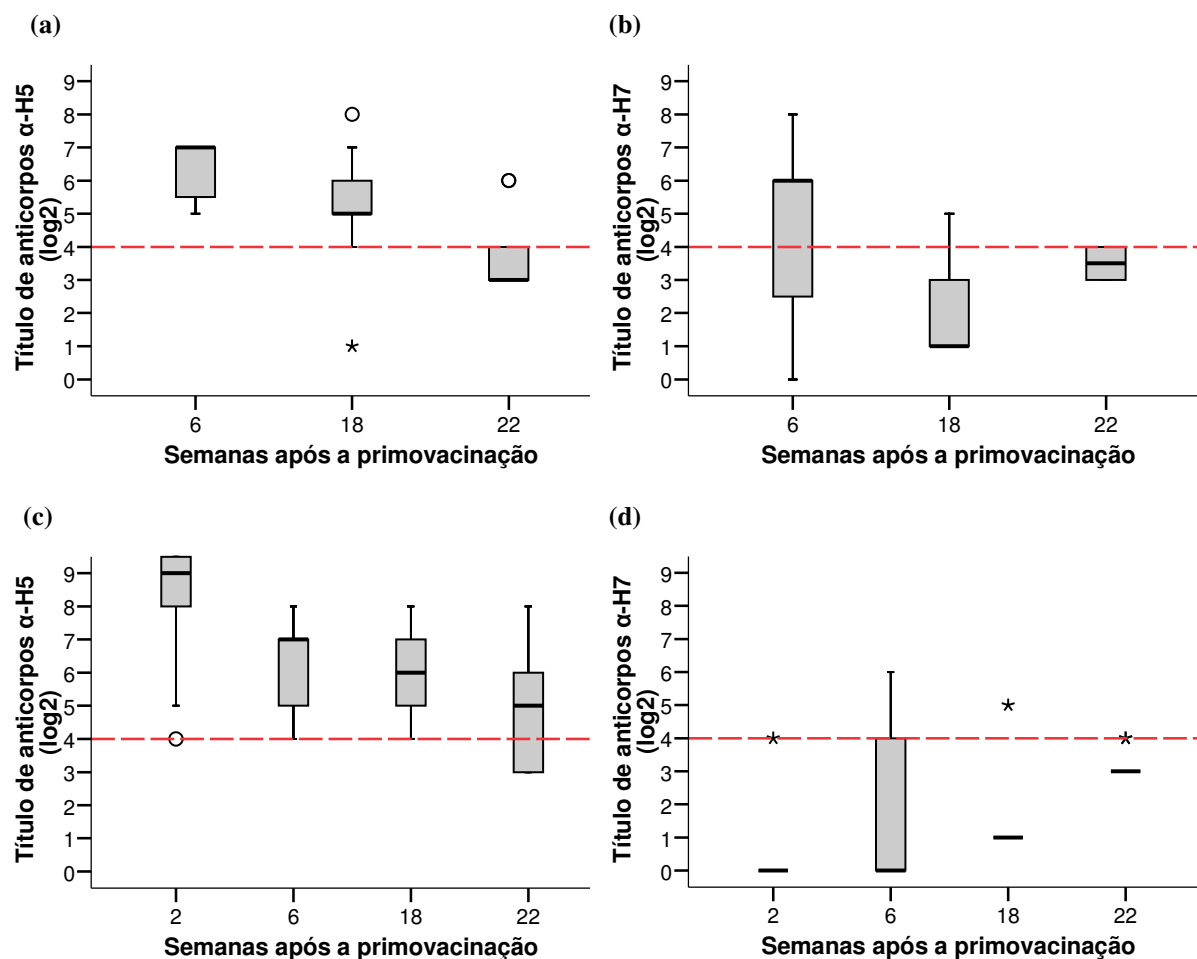
Relativamente aos patos do grupo B, vacinados contra a gripe aviária pela primeira vez, a resposta imunitária humoral para o subtipo H5 mostrou uma evolução similar àquela observada nos patos do estudo 1 (fig. 17c) (tabela 5). A taxa de imunização foi superior a 80% neste período. Contudo, a vacinação induziu uma resposta humoral pouco significativa ao subtipo H7 (fig.17d), sendo caracterizada por uma taxa de imunização máxima de 50,1% às 6 semanas após a primovacinação (limite máximo do intervalo de confiança de 95%) (tabela 5).

Tabela 5. Resposta humoral à vacinação preventiva nos patos do grupo B. Titulação de anticorpos específicos para H5 e para H7 por inibição de hemaglutinação (n=20).

Semanas após a primovacinação	Tx. Imunização H5 (IC ₉₅) ^a	Título médio α -H5 (IC ₉₅) ^b	Tx. Imunização H7 (IC ₉₅) ^a	Título médio α -H7 (IC ₉₅) ^c
2	100,0 (84,4 - 100)	8,7 (7,8 - 9,7)	5,0 (0 - 20,6)	4,0
6	100,0 (80,6 - 100)	6,2 (5,4 - 7,0)	30,8 (11,4 - 50,1)	4,5 (2,9 - 6,1)
18	100,0 (77,9 - 100)	5,9 (5,0 - 6,8)	10,0 (0 - 32,1)	1,4 (0,5 - 2,3)
22	70,0 (47,9 - 92,1)	5,1 (3,9 - 6,3)	20,0 (0 - 42,1)	3,2 (2,9 - 3,5)

^aIntervalo de confiança de 95%, considerando o erro associado à amostra; ^b, ^cTítulo médio de anticorpos específicos para H5 ou H7 calculado com base apenas nos animais seropositivos e expresso em log₂.

Fig. 17 (a-d). Titulação de anticorpos por inibição da hemaglutinação após a vacinação preventiva nos patos do grupo A (a, b) e nos patos do grupo B (c, d).



A linha vermelha tracejada assinala o título considerado protector ($4 \log_2$). As caixas indicam a mediana, o intervalo inter-quartil e a amplitude dos títulos obtidos. Os círculos representam os valores atípicos (*outliers*), e os asteriscos representam os valores extremos (*extreme*).

2.4 Discussão

Diversos ensaios experimentais têm sido realizados para avaliar a eficácia protectora de algumas vacinas da gripe aviária em galinhas (Bublöt et al., 2007a; Poetri et al., 2009; Veits et al., 2008; Webster et al., 2006b) e perus (Bos et al., 2008; Toffan et al., 2008). Alguns estudos recentes sugerem que estas vacinas também induzem imunidade protectora em patos domésticos (Beato et al., 2007; Kim et al., 2008; Middleton et al. 2007; Steensels et al., 2009; 2007; Van der Goot et al., 2008), mas ainda pouco é conhecido sobre a eficácia destas vacinas em patos e gansos em condições de campo.

O presente estudo baseia-se no programa de monitorização serológica incluído nos planos de vacinação de emergência e de vacinação preventiva implementados na sequência de um foco de gripe aviária de baixa patogenicidade, subtipo H5N2, ocorrido numa exploração cinegética nacional em Setembro de 2007. A vacinação com duas vacinas inactivadas bivalentes,

H5N9/H7N1 e H5N6/H7N7, foi realizada em dois grupos de patos-reais. Posteriormente, foi realizada uma revacinação semestral em apenas um destes grupos. A vacinação induziu um título de anticorpos específicos para a hemaglutinina H5 semelhante nos dois grupos de patos primovacinados, acima do limiar considerado de protecção ($4 \log_2$) e até pelo menos 16 semanas após a administração do reforço da vacina, tendo-se atingido uma taxa de imunização, no geral, superior a 80%. No caso da primovacinação com os subtipos H5N9 e H7N1 (Estudo 1) verifica-se que o título preconizado pelo fabricante ($8 \log_2$, de acordo com o teste de potência da vacina) terá sido atingido eventualmente apenas às 3 semanas após a primovacinação, no caso dos anticorpos anti-H5. O título médio de anticorpos para a H7 estão mais abaixo deste título “prometido”, sugerindo que factores inerentes à espécie (patos domésticos versus patos-reais) e às condições de vacinação (ensaio experimental versus vacinação em condições de campo) condicionam a resposta à vacinação. Relativamente à primovacinação com os subtipos H5N6 e H7N7 (Estudo 2 – grupo B), o título médio de anticorpos para o subtipo H5 induzido pela vacina é elevado, estando em consonância com as expectativas lançadas pelo fabricante da vacina ($6 \log_2$, de acordo com o teste de potência). Os títulos médios de anticorpos específicos para o subtipo H5 exibidos após a primovacinação (Estudo 1 e Estudo 2 – grupo B) mostraram-se bastante superiores àqueles descritos por Middleton et al. (2007) em patos domésticos vacinados ao primeiro dia de idade com a mesma vacina. No entanto, a resposta dos patos-reais foi ligeiramente inferior à resposta humoral induzida noutros ensaios laboratoriais realizados com patos domésticos também muito jovens, mas utilizando vacinas inactivadas monovalentes de subtipo H5N9 (Steensels et al., 2009) e de subtipo H5N2 (Beato et al., 2007; Van der Goot et al., 2008). Num ensaio realizado em condições de campo, Tian et al. (2005) mostraram que uma única administração da vacina inactivada de subtipo H5N1 é capaz de induzir um título elevado de anticorpos protectores em patos domésticos, persistindo até às 14 semanas após a primovacinação. Não obstante, a resposta humoral pode não ser suficiente para avaliar a imunidade protectora estimulada pelas vacinas da gripe aviária nestas aves, uma vez que em algumas situações se verifica que, mesmo em presença de um título de anticorpos baixo, há prevenção da morbidade e da mortalidade e redução significativa da excreção viral nas aves vacinadas, após infecção com um vírus de campo de alta patogenicidade (Kim et al., 2008; Middleton et al., 2007; Webster et al., 2006b). Isto sugere que a imunidade celular é muito importante na protecção contra o vírus Influenza A, embora não previna a infecção. Esta hipótese é comprovada por estudos realizados com galinhas, onde se observou que na ausência de anticorpos neutralizantes a resposta celular mediada por linfócitos T citotóxicos, dirigida contra proteínas internas conservadas da partícula viral, induz um efeito protector contra o

vírus H5N1 altamente patogénico, com prevenção dos sinais clínicos e redução da excreção viral (Seo et al., 2002; Seo & Webster, 2001).

A revacinação semestral com o antigénio H5N6 (Estudo 2 – grupo A) induziu uma resposta humoral pouco exuberante e menos duradoura, com persistência de anticorpos protectores apenas até às 6 semanas após a vacinação e com uma taxa de imunização mínima de aproximadamente 74% (IC₉₅: 73,6-100%). Estes resultados sugerem que os anticorpos induzidos pela vacinação anterior poderão ter interferido com a eficácia da segunda vacinação.

O antigénio H7N1 induziu um título médio de anticorpos ligeiramente acima do limiar de protecção, que persistiu até pelo menos 26 semanas após o reforço da vacina. Pelo contrário, o antigénio de subtipo H7N7 não estimulou o desenvolvimento de uma resposta humoral protectora para a hemaglutinina H7, não havendo na literatura referência a situações similares. De facto, a vacinação de aves pertencentes a jardins zoológicos, incluindo algumas espécies de patos e gansos, com vacinas inactivadas de subtipo H7 tem se revelado fortemente imunogénica (Furger et al., 2008; Philippa et al., 2005). A vacinação de faisões-dourados (*Chrysolophus pictus*) e marrequinhas-de-coleira (*Callonetta leucophrys*), em condições experimentais, mostrou-se eficaz na redução da morbilidade mas não impediu a infecção nem a excreção viral. O título de anticorpos induzido após duas administrações de vacina foi bastante inferior no caso dos faisões (Van der Goot et al., 2007). Do mesmo modo, outros estudos indicam que as vacinas inactivadas de subtipo H7N7 estimulam o desenvolvimento de um nível elevado de anticorpos protectores em galinhas, prevenindo os sinais clínicos e reduzindo, embora não inibam, a excreção viral após infecção com um vírus H7 de alta patogenicidade (Maas et al., 2009; Sakabe et al., 2008).

É importante realçar ainda que as amostras utilizadas para efeitos do presente estudo não são constituídas sempre pelos mesmos patos, devido às dificuldades de ordem logística na identificação e apanha sistemática destas aves. Este facto poderá explicar a presença do grau de variabilidade patente na resposta à vacinação neste estudo.

2.5 Conclusões

As diferenças que detectámos relativamente a outros estudos de vacinação reflectem provavelmente factores intrínsecos da espécie (*Anas platyrhynchos*), a idade das aves vacinadas, a utilização de diferentes estirpes de antigénios vacinais e de protocolos de vacinação (incluindo a dose e o intervalo de tempo entre a primovacinação e o reforço da vacina), assim como as condições em que foi realizada a vacinação. A observação neste

estudo de respostas vacinais diferentes para os subtipos H5 e H7 deve constitui um factor de alerta, chamando a atenção para o facto de que a vacinação deve ser utilizada apenas como uma medida adicional numa estratégia de controlo mais abrangente. É fundamental que, (i) para além da eliminação das aves infectadas e potencialmente infectadas, (ii) sejam implementadas medidas estritas de biossegurança na exploração, (iii) haja um controlo dos movimentos de aves vacinadas e dos seus produtos e (iv) o estabelecimento de uma rede de vigilância activa eficaz.

No geral, mesmo com o erro associado à amostra (considerando um intervalo de confiança de 95%), e com uma boa taxa de cobertura vacinal, conseguiu-se obter uma taxa de imunização superior a 80% no caso do subtipo H5, indicando que o número de animais susceptíveis é muito baixo. De facto, até à data, a rede de vigilância activa implementada na exploração vacinada e nas explorações envolventes não registou a re-introdução do vírus de campo na exploração. Recordamos que durante o mês de Outubro de 2007, todas as lagoas da exploração foram drenadas e que após esta medida, se espalhou óxido de cálcio (cal viva) no fundo das lagoas. Esta combinação de medidas preventivas terá destruído eventuais viriões que pudessem manter-se viáveis à altura da operação. A data de ocorrência do foco, Setembro de 2007, também terá contribuído para este desfecho pois a temperatura média do ar nesse mês foi superior ao valor médio do período de referência de 1961-1990 em cerca de 0,5°C. Tendo inclusive ocorrido uma onda de calor, com a duração de seis dias (de 1 a 6 de Setembro) em parte da região Centro e da região do Vale do Tejo (Instituto de Meteorologia, 2007). Porém, não foi possível abater todos os patos (N=90.365). A estimativa de perdas é de 8.404 (≈9%) que terão escapado à captura/abate e voados para lá dos limites da exploração, o que reforça a necessidade de recorrer à vacinação dos futuros bandos de aves a colocar na exploração.

O sucesso da experiência Portuguesa de gestão do foco de H5N2, com recurso à vacinação, sugere que, em sistemas de produção extensiva de *Anas platyrhynchos*, com uma probabilidade não-negligenciável de contacto com aves selvagens/migratórias, a revacinação semestral é uma medida complementar importante para circunscrever e reduzir/evitar focos secundários da infecção/doença. De facto, simulações feitas recentemente por Bouma et al. (2009) indicam que a probabilidade de ocorrência de um foco causado por vírus H5N1 de alta patogenicidade, assim como o seu raio, diminuem com o aumento da taxa de imunização, sendo que para conter um cenário de epidemia, 60% a 80% da população deverá estar imunizada.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, D. J. (2007). An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 25(30), 5637-5644.
- Banks, J., Speidel, E. S., Capua, I., Fioretti, A., Piccirillo, A., Moore, E., Plowright, L. & Alexander, D.J. (2001). Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *International Congress Series*, 1219, 363-367.
- Barrera, C. A. & Reyes-Terán, G. (2005). Influenza: forecast for a pandemic. *Archives of Medical Research*, 36(6), 628-636.
- Beato, M. S., Toffan, A., De Nardi, R., Cristalli, A., Terregino, C., Cattoli, G. & Capua, I. (2007). A conventional, inactivated oil emulsion vaccine suppresses shedding and prevents viral meat colonisation in commercial (Pekin) ducks challenged with HPAI H5N1. *Vaccine*, 25(20), 4064-4072.
- Belser, J. A., Blixt, O., Chen, L., Pappas, C., Maines, T. R., Van Hoeven, N., Donis, R., Busch, J., McBride, R., Paulson, J., Katz, J.M. & Tumpey, T.M. (2008). Contemporary North American influenza H7 viruses possess human receptor specificity: Implications for virus transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7558-7563.
- Belz, G. T., Xie, W. & Doherty, P. C. (2001). Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza a virus-specific CD8+ T cell responses. *Journal of Immunology*, 166(7), 4627-4633.
- Benton, K. A., Misplon, J. A., Lo, C. Y., Brutkiewicz, R. R., Prasad, S. A. & Epstein, S. L. (2001). Heterosubtypic immunity to influenza A virus in mice lacking IgA, all Ig, NKT cells, or gamma delta T cells. *Journal of Immunology*, 166(12), 7437-7445.
- Bertelsen, M. F., Klausen, J., Holm, E., Grøndahl, C. & Jørgensen, P. H. (2007). Serological response to vaccination against avian influenza in zoo-birds using an inactivated H5N9 vaccine. *Vaccine*, 25(22), 4345-4349.
- Beverley, P. (2001). Vaccination. In I. Roitt, J. Brostoff & D. Male (Eds.), *Immunology* (6th ed., pp. 277-287). Mosby.
- Bos, M. E. H., Nielen, M., Koch, G., Stegeman, A. & De Jong, M. C. M. (2008). Effect of H7N1 vaccination on highly pathogenic avian influenza H7N7 virus transmission in turkeys. *Vaccine*, 26(50), 6322-6328.
- Bouma, A., Claassen, I., Natih, K., Klinkenberg, D., Donnelly, C. A., Koch, G. & van Boven, M. (2009). Estimation of transmission parameters of H5N1 avian influenza virus in chickens. *PLoS Pathogens*, 5(1), e1000281.
- Bouvier, N. M. & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26, D49-D53.
- Bowes, V. A. (2007). After the outbreak: how the British Columbia commercial poultry industry recovered after H7N3 HPAI. *Avian Diseases*, 51(1), 313-316.

- Bowes, V. A., Ritchie, S. J., Byrne, S., Sojonky, K., Bidulka, J. J. & Robinson, J. H. (2004). Virus characterization, clinical presentation, and pathology associated with H7N3 avian influenza in British Columbia broiler breeder chickens in 2004. *Avian Diseases*, 48(4), 928-934.
- Boyce, W. M., Sandrock, C., Kreuder-Johnson, C., Kelly, T. & Cardona, C. (2009). Avian influenza viruses in wild birds: a moving target. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 275-286.
- Brown, J. D., Goekjian, G., Poulson, R., Valeika, S. & Stallknecht, D. E. (2009). Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 20-26.
- Brown, D. M., Román, E. & Swain, S. L. (2004). CD4 T cell responses to influenza infection. *Seminars in Immunology*, 16(3), 171-177.
- Brown, J. D., Swayne, D. E., Cooper, R. J., Burns, R. E. & Stallknecht, D. E. (2007). Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, 51(1), 285-289.
- Bublot, M., Le Gros, F., Nieddu, D., Pritchard, N., Mickle, T. R. & Swayne, D. E. (2007a). Efficacy of two H5N9-inactivated vaccines against challenge with a recent H5N1 highly pathogenic avian influenza isolate from a chicken in Thailand. *Avian Diseases*, 51(1), 332-337.
- Bublot, M., Pritchard, N., Cruz, J. S., Mickle, T. R., Selleck, P. & Swayne, D. E. (2007b). Efficacy of a fowlpox-vectored avian influenza H5 vaccine against Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus challenge. *Avian Diseases*, 51(1), 498-500.
- Busani, L. (2009). Low pathogenicity avian influenza in Italy in 2007-2008 [PowerPoint slides]. Acedido em 15 de Maio de 2009 em <http://www.poultrymed.com/Poultry/Templates/ShowPage.asp?DBID=1&LNGID=1&TMID=111&FID=352&PID=0&IID=7044>.
- Busani, L., Valsecchi, M. G., Rossi, E., Toson, M., Ferrè, N., Pozza, M. D., Dalla Pozza, M. & Marangon, S. (2009). Risk factors for highly pathogenic H7N1 avian influenza virus infection in poultry during the 1999–2000 epidemic in Italy. *The Veterinary Journal*, 181(2), 171-177.
- Butt, K. M., Smith, G. J. D., Chen, H., Zhang, L. J., Leung, Y. H. C., Xu, K. M., Lim, W., Webster, R.G., Yuen, K.Y., Peiris, J.S.M. & Guan, Y. (2005). Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5760-5767.
- Capua, I. (2007). Vaccination for notifiable avian influenza in poultry. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, 26(1), 217-227.
- Capua, I. & Alexander, D. J. (2008). Ecology, epidemiology and human health implications of avian influenza viruses: why do we need to share genetic data? *Zoonoses and Public Health*, 55(1), 2-15.

- Capua, I. & Marangon, S. (2007a). Control and prevention of avian influenza in an evolving scenario. *Vaccine*, 25(30), 5645-5652.
- Capua, I. & Marangon, S. (2007b). The use of vaccination to combat multiple introductions of Notifiable Avian Influenza viruses of the H5 and H7 subtypes between 2000 and 2006 in Italy. *Vaccine*, 25(27), 4987-4995.
- Capua, I., Mutinelli, F., Marangon, S. & Alexander, D. J. (2000). H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 29(6), 537-543.
- Capua, I., Mutinelli, F., Pozza, M. D., Donatelli, I., Puzelli, S. & Cancellotti, F. M. (2002). The 1999–2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications. *Acta Tropica*, 83(1), 7-11.
- Chen, H., Li, Y., Li, Z., Shi, J., Shinya, K., Deng, G., Qi, Q., Tian, G., Fan, S., Zhao, H., Sun, Y. & Kawaoka, Y. (2006). Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *Journal of Virology*, 80(12), 5976-5983.
- Chen, H., Smith, G. J. D., Zhang, S. Y., Qin, K., Wang, J., Li, K. S., Webster, R.G., Peiris, J.S. & Guan, Y. (2005). Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*, 436(7048), 191-192.
- Choi, Y. K., Nguyen, T. D., Ozaki, H., Webby, R. J., Puthavathana, P., Buranathal, C., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Hanh, N.T., Ma, S.K., Hui, P.Y., Guan, Y., Peiris, J.S. & Webster, R.G. (2005). Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of Virology*, 79(16), 10821-10825.
- Choi, Y. K., Ozaki, H., Webby, R. J., Webster, R. G., Peiris, J. S., Poon, L., Butt, C., Leung, Y.H. & Guan, Y. (2004). Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *Journal of Virology*, 78(16), 8609-8614.
- Colman, P. M. (1994). Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 3(10), 1687-1696.
- Cong, Y. L., Pu, J., Liu, Q. F., Wang, S., Zhang, G. Z., Zhang, X. L., Fan, W.X., Brown, E.G. & Liu, J.H. (2007). Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China. *The Journal of General Virology*, 88(7), 2035-2041.
- Decisão 2000/721/CE da Comissão, de 7 de Novembro de 2000, que diz respeito à introdução da vacinação para suplementar as medidas destinadas a controlar a gripe aviária em Itália e às medidas específicas de controlo das deslocações. *Jornal Oficial nº L 291 de 18/11/2000*, pp. 0033-0036.
- Decisão 2001/847/CE da Comissão, de 30 de Novembro de 2001, que altera pela terceira vez a Decisão 2000/721/CE, no que respeita ao programa italiano de vacinação contra a gripe aviária e às restrições comerciais actualmente aplicáveis à carne fresca originária de perus vacinados. *Jornal Oficial nº L 315 de 01/12/2001*, pp. 0061-0063.

- Decisão 2002/975/CE da Comissão, de 12 de Dezembro de 2002, que diz respeito à introdução da vacinação para suplementar as medidas destinadas a controlar as infecções de gripe aviária de baixa patogenicidade em Itália e às medidas específicas de controlo das deslocações. *Jornal Oficial n° L 337 de 13/12/2002*, pp. 0087-0092.
- Decisão 2004/666/CE da Comissão, de 29 de Setembro de 2004, relativa à introdução da vacinação para suplementar as medidas destinadas a controlar as infecções de gripe aviária de baixa patogenicidade em Itália e às medidas específicas de controlo das deslocações e que revoga a Decisão 2002/975/CE. *Jornal Oficial n° L 303 de 30/09/2004*, pp. 0035-0044.
- Decisão 2006/53/CE do Conselho, de 23 de Janeiro de 2006, que altera a Decisão 90/424/CEE relativa a determinadas despesas no domínio veterinário. *Jornal Oficial n° L 029 de 02/02/2006*, pp. 0037-0038.
- Decisão 2006/147/CE da Comissão, de 24 de Fevereiro de 2006, relativa à introdução de vacinação preventiva contra a gripe aviária de alta patogenicidade H5N1 e das respectivas disposições em matéria de circulação nos Países Baixos. *Jornal Oficial n° L 055 de 25/02/2006*, pp. 0047-0050.
- Decisão 2006/148/CE da Comissão, de 24 de Fevereiro de 2006, relativa à introdução de vacinação preventiva contra a gripe aviária de alta patogenicidade H5N1 e das respectivas disposições em matéria de circulação em França. *Jornal Oficial n° L 055 de 25/02/2006*, pp. 0051-0057.
- Decisão 2006/437/CE da Comissão, de 4 de Agosto de 2006, que aprova um manual de diagnóstico da gripe aviária, conforme previsto na Directiva 2005/94/CE do Conselho. *Jornal Oficial n° L 237 de 31/08/2006*, pp. 0001-0027.
- Decisão 2006/705/CE da Comissão, de 20 de Outubro de 2006, que aprova o plano de vacinação preventiva contra a gripe aviária de subtipo H5 em determinadas explorações na Renânia do Norte-Vestefália, apresentado pela Alemanha ao abrigo da Directiva 2005/94/CE do Conselho. *Jornal Oficial n° L 291 de 21/10/2006*, pp. 0038-0039.
- Decisão 2007/590/CE da Comissão, de 27 de Agosto de 2007, relativa à introdução de vacinação preventiva contra a gripe aviária de alta patogenicidade e das respectivas disposições em matéria de circulação nos Países Baixos. *Jornal Oficial n° L 222 de 28/08/2007*, pp. 0016-0020.
- Decisão 2007/598/CE da Comissão, de 28 de Agosto de 2007, relativa a medidas destinadas a impedir a propagação da gripe aviária de alta patogenicidade a outras aves de cativeiro mantidas em jardins zoológicos e a organismos, institutos ou centros aprovados nos Estados-Membros. *Jornal Oficial n° L 230 de 01/09/2007*, pp. 0020-0026.
- Decisão 2007/638/CE da Comissão, de 24 de Setembro de 2007, relativa à vacinação de emergência em Itália de aves de capoeira contra a gripe aviária de baixa patogenicidade. *Jornal Oficial n° L 258 de 04/10/2007*, pp. 0031-0038.

- Decisão 2007/268/CE da Comissão, de 13 de Abril de 2007, relativa à execução de programas de vigilância da gripe aviária em aves de capoeira e aves selvagens a efectuar nos Estados-Membros e que altera a Decisão 2004/450/CE. *Jornal Oficial* nº L 115 de 03/05/2007, pp. 0003-0017.
- Decisão 2008/285/CE da Comissão, de 19 de Março de 2008, relativa à vacinação de emergência contra a gripe aviária de baixa patogenicidade em patos-reais em Portugal e a certas medidas restritivas da circulação destas aves de capoeira e de produtos delas derivados. *Jornal Oficial* nº L 092 de 03/04/2008, pp. 0037-0039.
- Decisão 2008/838/CE da Comissão, de 3 de Novembro de 2008, relativa à vacinação preventiva contra a gripe aviária de baixa patogenicidade em patos-reais em Portugal e a certas medidas restritivas da circulação destas aves de capoeira e de produtos delas derivados. *Jornal Oficial* nº L 299 de 08/11/2008, pp. 0040-0042.
- Decisão 2009/437/CE da Comissão, de 8 de Junho de 2009, que altera a Decisão 2007/268/CE relativa à execução de programas de vigilância da gripe aviária em aves de capoeira e aves selvagens a efectuar nos Estados-Membros. *Jornal Oficial* nº L 145 de 10/06/2009, pp. 0045-0046.
- De Filette, M., Martens, W., Smet, A., Schotsaert, M., Birkett, A., Londoño-Arcila, P., Fiers, W. & Saelens, X. (2008). Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies. *Vaccine*, 26(51), 6503-6507.
- DGV (Direcção Geral de Veterinária). (2009). Programa de vigilância da gripe aviária em aves de capoeira e aves selvagens para 2009. Direcção de Serviços de Saúde e Protecção Animal.
- Directiva 2005/94/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2005, relativa a medidas comunitárias de luta contra a gripe aviária e que revoga a Directiva 92/40/CE. *Jornal Oficial* nº L 010 de 14/01/2006, pp. 0016-0065.
- Ellis, T. M., Leung, C., Chow, M. K. W., Bissett, L. A., Wong, W., Guan, Y. & Peiris, J.S.M. (2004). Vaccination of chickens against H5N1 avian influenza in the face of an outbreak interrupts virus transmission. *Avian Pathology*, 33(4), 405-412.
- Epstein, S. L., Tumpey, T. M., Misplon, J. A., Lo, C., Cooper, L. A., Subbarao, K., Renshaw, M., Sambhara, S. & Katz, J.M. (2002). DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerging Infectious Diseases*, 8(8), 796-801.
- FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). (2006). Preparing for Highly Pathogenic Avian Influenza. Animal Production and Health Manual No. 3. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/010/a0632e/a0632e00.htm>.
- FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). (2008a). Biosecurity for Highly Pathogenic Avian Influenza. Issue and Options. Animal Production and Health Paper No.165. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/011/i0359e/i0359e00.htm>.

- FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). (2008b). The Global Strategy for the Prevention and Control of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/011/aj134e/aj134e00.htm>.
- FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). (2009a). Update on the avian influenza situation. FAO Avian Influenza Disease Emergency News (FAO AIDE News), Issue 59. Acedido em 8 de Julho de 2009, disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/ak071e/ak071e00.pdf>.
- FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). (2009b). Avian influenza vaccine producers and suppliers for poultry. FAO Emergency Prevention System for Transboundary Animal and Plant Pests and Diseases (EMPRES). Acedido em 8 de Maio, 2009 em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/ai326e/ai326e00.pdf>.
- Flynn, K. J., Belz, G. T., Altman, J. D., Ahmed, R., Woodland, D. L. & Doherty, P. C. (1998). Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia. *Immunity*, 8(6), 683-691.
- Fouchier, R. A. M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*, 79(5), 2814-2822.
- Fujii, K., Kakumoto, C., Kobayashi, M., Saito, S., Kariya, T., Watanabe, Y., Sakoda, Y., Kida, H. & Suzuki, M. (2007). Serological evidence of influenza A virus infection in Kuril harbor seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) of Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 69(3), 259-263.
- Furger, M., Hoop, R., Steinmetz, H., Eulenberger, U., & Hatt, J. (2008). Humoral immune response to avian influenza vaccination over a six-month period in different species of captive wild birds. *Avian Diseases*, 52(2), 222-228.
- Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Webster, R. G. & Matrosovich, M.N. (2003). Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken and receptor specificity of the 1997 H5N1 chicken and human influenza viruses from Hong Kong. *Avian Diseases*, 47(3), 1154-1160.
- Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., et al. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, May 22 [Epub ahead of print]. Disponível em <http://www.sciencemag.org/cgi/rapidpdf/1176225v1.pdf>.
- Garske, T., Clarke, P. & Ghani, A. C. (2007). The transmissibility of highly pathogenic avian influenza in commercial poultry in industrialised countries. *PLoS ONE*, 2(4), e349.
- Gerhard, W., Mozdzanowska, K. & Zharikova, D. (2006). Prospects for universal influenza virus vaccine. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 569-574.

- Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S. & Webster, R. G. (1999). Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9363-9367.
- Guo, Y., Wang, M., Kawaoka, Y., Gorman, O., Ito, T., Saito, T. & Webster, R.J. (1992). Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology*, 188(1), 245-255.
- Instituto de Meteorologia. (2007). Informação climática Setembro 2007. Acedido em Maio 26, 2009 em http://www.meteo.pt/resources/www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/AAWIXaDhvfLFbmNeMbOa/cli_20070901_20070930_pcl_mm_co_pt.pdf.
- Jong, M. D. & Hien, T. T. (2006). Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 35(1), 2-13.
- Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Kuiken, T., Fouchier, R. A. M., Amonsin, A., Payungporn, S., Noppornpanth, S., Wattanodorn, S., Theambooniers, A., Tantilertcharoen, R., Pattanarangsarn, R., Arya, N., Ratanakorn, P., Osterhaus, D.M. & Poovorawan, Y. (2004). Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2189-2191.
- Keawcharoen, J., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W. E., van Lavieren, R., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A. & Kuiken, T. (2008). Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases*, 14(4), 600-607.
- Kelly, T. R., Hawkins, M. G., Sandrock, C. E. & Boyce, W. M. (2008). A review of highly pathogenic avian influenza in birds, with an emphasis on Asian H5N1 and recommendations for prevention and control. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 22(1), 1-16.
- Kim, J., Seiler, P., Forrest, H. L., Khalenkov, A. M., Franks, J., Kumar, M., Karesh, W.B., Gilbert, M., Sodnomdarjaa, R., Douangneun, B., Govorkova, E.A. & Webster, R.G. (2008). Pathogenicity and vaccine efficacy of different clades of Asian H5N1 avian influenza A viruses in domestic ducks. *Journal of Virology*, 82(22), 11374-11382.
- Koopmans, M., Wilbrink, B., Conyn, M., Natrop, G., van der Nat, H., Vennema, H., Meijer, A., van Steenbergen, J., Fouchier, R., Osterhaus, A. & Bosman, A. (2004). Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*, 363(9409), 587-593.
- Krauss, S., Obert, C. A., Franks, J., Walker, D., Jones, K., Seiler, P., Niles, L., Pryor, S.P., Obenauer, J.C., Naeve, C.W., Widjaja, L., Webby, R.J. & Webster, R.G. (2007). Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. *PLoS Pathogens*, 3(11), e167.
- Kuchipudi, S. V., Nelli, R., White, G. A., Bain, M., Chang, K. C. & Dunham, S. (2009). Differences in influenza virus receptors in chickens and ducks: Implications for interspecies transmission. *J Mol Genet Med*, 3(1), 143-151.

- Lambrecht, B., Steensels, M., Van Borm, S., Meulemans, G. & van den Berg, T. (2007). Development of an M2e-specific enzyme-linked immunosorbent assay for differentiating infected from vaccinated animals. *Avian Diseases*, 51(1), 221-226.
- Lawrence, C. W., Ream, R. M. & Braciale, T. J. (2005). Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8+ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. *Journal of Immunology*, 174(9), 5332-5340.
- Lee, C., Senne, D. A. & Suarez, D. L. (2004). Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *Journal of Virology*, 78(15), 8372-8381.
- Li, K. S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G. J. D., Xu, K. M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shortridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. & Peiris, J.S. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 430(6996), 209-213.
- Ligon, B. L. (2005). Avian influenza virus H5N1: a review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 16(4), 326-335.
- Lin, Y. P., Shaw, M., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W., Klimov, A., Subbarao, K., Guan, Y., Krauss, S., Shortridge, K., Webster, R., Cox, N. & Hay, A. (2000). Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9654-9658.
- Lipatov, A. S., Kwon, Y. K., Sarmiento, L. V., Lager, K. M., Spackman, E., Suarez, D. L. & Swayne, D.E. (2008). Domestic pigs have low susceptibility to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *PLoS Pathogens*, 4(7), e1000102.
- Lupiani, B. & Reddy, S. M. (2009). The history of avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 311-323.
- Maas, R., Tacken, M., Zoelen, D. V. & Oei, H. (2009). Dose response effects of avian influenza (H7N7) vaccination of chickens: Serology, clinical protection and reduction of virus excretion. *Vaccine*, 27(27), 3592-3597.
- Marangon, S., Cecchinato, M. & Capua, I. (2008). Use of Vaccination in Avian Influenza Control and Eradication. *Zoonoses and Public Health*, 55(1), 65-72.
- Matrosovich, M. N., Krauss, S. & Webster, R. G. (2001). H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*, 281(2), 156-162.
- Middleton, D., Bingham, J., Selleck, P., Lowther, S., Gleeson, L., Lehrbach, P., Robinson, S., Rodenberg, J., Kumar, M. & Andrew, M. (2007). Efficacy of inactivated vaccines against H5N1 avian influenza infection in ducks. *Virology*, 359(1), 66-71.
- Morens, D. M. & Fauci, A. S. (2007). The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(7), 1018-1028.

- Munster, V. J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W.E., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A.D. & Fouchier, R.A. (2007). Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathogens*, 3(5), e61.
- Nash, T. (2001). Immunity to viruses. In I. Roitt, J. Brostoff, & D. Male (Eds.), *Immunology* (6th ed., pp. 235-243). Mosby.
- Nelson, M. I., Viboud, C., Simonsen, L., Bennett, R. T., Griesemer, S. B., St George, K., Taylor, J., Spiro, D.J., Sengamalay, N.A., Ghedin, E., Taubenberger, J.K. & Holmes, E.C. (2008). Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLoS Pathogens*, 4(2), e1000012.
- Ninomiya, A., Takada, A., Okazaki, K., Shortridge, K. F. & Kida, H. (2002). Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. *Veterinary Microbiology*, 88(2), 107-114.
- Ohishi, K., Ninomiya, A., Kida, H., Park, C., Maruyama, T., Arai, T., Katsumata, E., Tobayama, T., Boltunov, A.N., Khuraskin, L.S. & Miyazaki, N. (2002). Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiology and Immunology*, 46(9), 639-644.
- OIE (World Organisation for Animal Health). (2007). Information document on avian influenza vaccination. Acedido em 10 de Maio de 2009 em http://www.oie.int/Eng/info_ev/Other%20Files/A_Guidelines%20on%20AI%20vaccination.pdf.
- OIE (World Organisation for Animal Health). (2008). Avian Influenza. In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Acedido em 21 de Janeiro de 2009 em http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.
- Olofsson, S., Kumlin, U., Dimock, K. & Arnberg, N. (2005). Avian influenza and sialic acid receptors: more than meets the eye? *The Lancet Infectious Diseases*, 5(3), 184-188.
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E. & Fouchier, R. A. M. (2006). Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 384-388.
- O'Neill, E., Krauss, S. L., Riberdy, J. M., Webster, R. G., & Woodland, D. L. (2000). Heterologous protection against lethal A/HongKong/156/97 (H5N1) influenza virus infection in C57BL/6 mice. *The Journal of General Virology*, 81(11), 2689-2696.
- Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M., & Fouchier, R. A. (2000). Influenza B virus in seals. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5468), 1051-1053.
- PAHO (Pan American Health Organization). (2009). Considerations and interim recommendations for the clinical management of human infection with the new Influenza A(H1N1) virus. PAHO/WHO expert consultation. Washington DC, 26 May 2009. Acedido em 9 de Julho, 2009 em http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=2162&Itemid=.

- Palese, P. & Shaw, M. L. (2007). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In D. Knipe & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (5th ed., pp. 1647-1689). Lippincott-Williams & Wilkins.
- Park, A. W. & Glass, K. (2007). Dynamic patterns of avian and human influenza in east and southeast Asia. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(8), 543-548.
- Pavlova, S. P., Veits, J., Keil, G. M., Mettenleiter, T. C. & Fuchs, W. (2009). Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. *Vaccine*, 27(5), 773-785.
- Peiris, J. S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G. & Shortridge, K. F. (2001). Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *Journal of Virology*, 75(20), 9679-9686.
- Peyre, M., Fusheng, G., Desvaux, S. & Roger, F. (2009). Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiology and Infection*, 137(1), 1-21.
- Philippa, J., Baas, C., Beyer, W., Bestebroer, T.M., Fouchier, R.A., Smith, D., Schaftenaar, W. & Osterhaus, A.D. (2007). Vaccination against highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in zoos using an adjuvanted inactivated H5N2 vaccine. *Vaccine*, 25(19), 3800-3808.
- Philippa, J. D., Munster, V. J., Bolhuis, H. V., Bestebroer, T. M., Schaftenaar, W., Beyer, W. E., Fouchier, R.A., Kuiken, T. & Osterhaus, A.D. (2005). Highly pathogenic avian influenza (H7N7): Vaccination of zoo birds and transmission to non-poultry species. *Vaccine*, 23(50), 5743-5750.
- Poetri, O., Bouma, A., Murtini, S., Claassen, I., Koch, G., Soejoedono, R. D., Stegeman, J.A. & van Boven, M. (2009). An inactivated H5N2 vaccine reduces transmission of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus among native chickens. *Vaccine*, 27(21), 2864-2869.
- Puzelli, S., Di Trani, L., Fabiani, C., Campitelli, L., De Marco, M. A., Capua, I., Aquilera, J.F., Zambon, M., Donatelli, I. (2005). Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(8), 1318-1322.
- Qiao, C., Jiang, Y., Tian, G., Wang, X., Li, C., Xin, X., Chen, H. & Yu, K. (2009). Recombinant fowlpox virus vector-based vaccine completely protects chickens from H5N1 avian influenza virus. *Antiviral Research*, 81(3), 234-238.
- Rimmelzwaan, G. F., van Riel, D., Baars, M., Bestebroer, T. M., van Amerongen, G., Fouchier, R. A., Osterhaus A.D. & Kuiken, T. (2006). Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *The American Journal of Pathology*, 168(1), 176-183.

- Rudolf, M. (2007). AI vaccination using licensed inactivated H5 vaccines under field conditions in layer hens, geese parents and fattening ducks: Protection after primary and booster vaccination [PowerPoint slides]. Acedido em 15 de Maio de 2009 em http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/docs/2007/12_rudolph.pdf.
- Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokumai, N., Kawaoka, Y. & Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine*, 26(17), 2127-2134.
- SCFCAH. (2006). Discussion paper on vaccination of poultry against highly pathogenic avian influenza H5N1 (DIVA strategy). Document SANCO/10103/2006 – Rev.3. Standing Committee on The Food Chain and Animal Health (SCFCAH). Acedido em 18 de Janeiro de 2009 em http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/discussion_paper.pdf.
- Seo, S. H., Peiris, M. & Webster, R. G. (2002). Protective cross-reactive cellular immunity to lethal A/Goose/Guangdong/1/96-like H5N1 influenza virus is correlated with the proportion of pulmonary CD8(+) T cells expressing gamma interferon. *Journal of Virology*, 76(10), 4886-4890.
- Seo, S. H. & Webster, R. G. (2001). Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. *Journal of Virology*, 75(6), 2516-2525.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. & Kawaoka, Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 440(7083), 435-436.
- Skehel, J. J., Cross, K., Steinhauer, D. & Wiley, D. C. (2001). Influenza fusion peptides. *Biochemical Society Transactions*, 29(4), 623-626.
- Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 531-569.
- Songserm, T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A., Chutinimitkul, S., Thanawongnuwech, R. & Poovorawan, Y. (2006). Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerging Infectious Diseases*, 12(11), 1744-1747.
- Steensels, M., Bublot, M., Van Borm, S., De Vriese, J., Lambrecht, B., Richard-Mazet, A., Chanavat-Bizzini, S., Duboeuf, M., Le Gross, F.X. & van den Berg, T. (2009). Prime-boost vaccination with a fowlpox vector and an inactivated avian influenza vaccine is highly immunogenic in Pekin ducks challenged with Asian H5N1 HPAI. *Vaccine*, 27(5), 646-654.
- Steensels, M., Van Borm, S., Lambrecht, B., De Vriese, J., Le Gros, F. X., Bublot, M. & van den Berg, T. (2007). Efficacy of an inactivated and a fowlpox-vectored vaccine in Muscovy ducks against an Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viral challenge. *Avian Diseases*, 51(1), 325-331.

- Stegeman, A., Bouma, A., Elbers, A. R. W., de Jong, M. C. M., Nodelijk, G., de Klerk, F., Koch, G. & van Boven, M. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003: course of the epidemic and effectiveness of control measures. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(12), 2088-2095.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T. M., Taubenberger, J. K., Paulson, J. C. & Wilson, I. A. (2006). Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 404-410.
- Sturm-Ramirez, K. M., Hulse-Post, D. J., Govorkova, E. A., Humberd, J., Seiler, P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Chaisingh, A., Long, H.T., Naipospos, T.S., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S. & Webster, R.G. (2005). Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *Journal of Virology*, 79(17), 11269-11279.
- Swayne, D. E. (2006). Principles for vaccine protection in chickens and domestic waterfowl against avian influenza: emphasis on Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 174-181.
- Swayne, D. E. (2009). Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 351-363.
- Swayne, D. E., Beck, J. R. & Kinney, N. (2000). Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Diseases*, 44(1), 132-137.
- Tashiro, M. (2008). Specific characteristics of interest for public health [PowerPoint slides]. Acedido em 10 de Março de 2009 em http://www.fao.org/avianflu/en/conferences/verona_2008.html
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., Wang, R., Jin, G. & Fanning, T. G. (2005). Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 437(7060), 889-893.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tantilertcharoen, R., Damrongwatanapokin, S., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Nanthapornphiphat, K., Ratanamungklanon, S., Tunak, E., Songserm, T., Vivatthanavanich, V., Lekdumrongsak, T., Kesdangsakonwut, S., Tunhikorn, S. & Poovorawan, Y. (2005). Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerging Infectious Diseases*, 11(5), 699-701.
- Thiry, E., Zicola, A., Addie, D., Egberink, H., Hartmann, K., Lutz, H., Poulet, H. & Horzinek, M.C. (2007). Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Veterinary Microbiology*, 122(1-2), 25-31.
- Thomas, P. G., Keating, R., Hulse-Post, D. J. & Doherty, P. C. (2006). Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), 48-54.
- Tian, G., Zhang, S., Li, Y., Bu, Z., Liu, P., Zhou, J., Li, C., Shi, J., Yu, K. & Chen, H. (2005). Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology*, 341(1), 153-162.

- Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Bertoli, E., Salviato, A., Cattoli, G., Terregino, C. & Capua, I. (2008). Conventional inactivated bivalent H5/H7 vaccine prevents viral localization in muscles of turkeys infected experimentally with low pathogenic avian influenza and highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 37(4), 407-412.
- Tompkins, S. M., Zhao, Z.S., Lo, C.Y., Mispelon, J. A., Liu, T., Ye, Z., Hogan, R.J., Wu, Z., Benton, K.A., Tumpey, T.M. & Epstein, S.L. (2007). Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 426-435.
- Trifonov, V., Khiabani H., Greenbaum, B. & Rabadan, R. (2009). The origin of the recent swine influenza A(H1N1) virus infecting humans. *Eurosurveillance*, 14(17), pii: 19193. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N17/art19193.pdf>.
- Tumpey, T. M., Alvarez, R., Swayne, D. E. & Suarez, D. L. (2005). Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 676-683.
- Tweed, S. A., Skowronski, D. M., David, S. T., Larder, A., Petric, M., Lees, W., Li, Y., Katz, J., Krajden, M., Tellier, R., Halpert, C., Hirst, M., Astell, C., Lawrence, D. & Mak, A. (2004). Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2196-2199.
- Van Borm, S., Thomas, I., Hanquet, G., Lambrecht, B., Boschmans, M., Dupont, G., Decaestecker, M., Snacken, R. & van den Berg, T. (2005). Highly pathogenic H5N1 influenza virus in smuggled Thai eagles, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*, 11(5), 702-705.
- Van den Berg, T., Lambrecht, B., Marché, S., Steensels, M., van Borm, S. & Bublot, M. (2008). Influenza vaccines and vaccination strategies in birds. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(2-3), 121-165.
- Van der Goot, J. A., van Boven, M., Koch, G. & de Jong, M. C. (2007). Variable effect of vaccination against highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus on disease and transmission in pheasants and teals. *Vaccine*, 25(49), 8318-8325.
- Van der Goot, J. A., van Boven, M., Stegeman, A., van de Water, S.G., de Jong, M. C. & Koch, G. (2008). Transmission of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in Pekin ducks is significantly reduced by a genetically distant H5N2 vaccine. *Virology*, 382(1), 91-97.
- Van der Goot, J. A., Koch, G., de Jong, M. C. & van Boven, M. (2005). Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18141-18146.
- Van Reeth, K. (2007). Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary Research*, 38(2), 243-260. doi: 10.1051/vetres:2006062.

- Veits, J., Romer-Oberdorfer, A., Helferich, D., Durban, M., Suezer, Y., Sutter, G. & Mettenleiter, T.C. (2008). Protective efficacy of several vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus under experimental conditions. *Vaccine*, 26(13), 1688-1696.
- Veits, J., Wiesner, D., Fuchs, W., Hoffmann, B., Granzow, H., Starick, E., Mundt, E., Schirrmeier, H., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C. & Romer-Oberdorfer, A. (2006). Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), 8197-8202.
- Wan, H., Sorrell, E. M., Song, H., Hossain, M. J., Ramirez-Nieto, G., Monne, I., Stevens, J., Cattoli, G., Capua, I., Chen, L.M., Donis, R.O., Busch, J., Paulson, J.C, Brockwell, C., Webby, R., Blanco, J., Al-Natour, M.Q., Perez, D.R. (2008). Replication and transmission of H9N2 influenza viruses in ferrets: evaluation of pandemic potential. *PLoS ONE*, 3(8), e2923.
- Wang, G., Zhan, D., Li, L., Lei, F., Liu, B., Liu, D., Xiao, H., Feng, Y., Li, J., Yang, B., Yin, Z., Song, X., Zhu, X., Cong, Y., Pu, J., Wang, J., Liu, J., Gao, G.F. & Zhu, Q. (2008). H5N1 avian influenza re-emergence of Lake Qinghai: phylogenetic and antigenic analyses of the newly isolated viruses and roles of migratory birds in virus circulation. *The Journal of General Virology*, 89(3), 697-702.
- Webster, R. G., Hulse-Post, D. J., Sturm-Ramirez, K. M., Guan, Y., Peiris, M., Smith, G. & Chen, H. (2007). Changing epidemiology and ecology of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. *Avian Diseases*, 51(1), 269-272.
- Webster, R. G., Peiris, M., Chen, H. & Guan, Y. (2006a). H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), 3-8.
- Webster, R. G., Webby, R. J., Hoffmann, E., Rodenberg, J., Kumar, M., Chu, H., Seiler, P., Krauss, S. & Songserm, T. (2006b). The immunogenicity and efficacy against H5N1 challenge of reverse genetics-derived H5N3 influenza vaccine in ducks and chickens. *Virology*, 351(2), 303-311.
- Werner, O. & Harder, T. (2006). Avian Influenza. In B. Kamps, C. Hoffmann, & W. Preiser (Eds.), *Influenza Report 2006*. Flying Publisher. (pp. 48-86). Acedido em 11 de Março de 2009 em <http://www.influenzareport.com/>.
- WHO (World Health Organization). (2005). Guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics. World Health Organization (WHO). Acedido em 25 de Abril de 2009 em http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_6.pdf.
- WHO (World Health Organization). (2009a). Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) reported to WHO. Acedido em 8 de Julho, 2009 em http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_07_01/en/index.html.

- WHO (World Health Organization). (2009b). Human-animal interface aspects of Influenza A (H1N1) (Rev. 1). INFOSAN (International Food Safety Authorities Network) Information Note No. 2/2009, 30 April 2009. Acedido em 9 de Julho, 2009 em http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_influenza_Apr09_en_rev1.pdf.
- WHO (World Health Organization). (2009c). Influenza A (H1N1). Statement to the press by WHO Director-General Dr. Margaret Chan, 29 April 2009. Disponível em http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_20090429/en/index.html.
- WHO (World Health Organization). (2009d). Laboratory-confirmed cases of pandemic (H1N1) 2009 as officially reported to WHO by States Parties to the International Health Regulations (2005). Acedido em 8 de Julho, 2009 em http://www.who.int/csr/don/2009_07_06/en/index.html.
- WHO (World Health Organization). (2009e). Swine Influenza A. Statement to the press by WHO Director-General Dr. Margaret Chan, 27 April 2009. Disponível em http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_20090427/en/index.html.
- WHO (World Health Organization). (2009f). World now at the start of 2009 influenza pandemic. Statement to the press by WHO Director-General Dr. Margaret Chan, 11 June 2009. Disponível em http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html.
- Wit, E. & Fouchier, R. A. M. (2008). Emerging influenza. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 41(1), 1-6.
- Wright, P., Neumann, G. & Kawaoka, Y. (2007). Orthomyxoviruses. In P. Howley & D. Knipe (Eds.), *Fields Virology* (Fifth edition., pp. 1691-1740). Lippincott-Williams & Wilkins.
- Xu, K. M., Smith, G. J., Bahl, J., Duan, L., Tai, H., Vijaykrishna, D., Wang, J., Zhang, J.X., Li, K.S., Fan, X.H., Webster, R.G., Chen, H., Peiris, J.S. & Guan, Y. (2007). The genesis and evolution of H9N2 influenza viruses in poultry from southern China, 2000 to 2005. *Journal of Virology*, 81(19), 10389-10401.
- Xu, X., Subbarao, Cox, N. J. & Guo, Y. (1999). Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology*, 261(1), 15-19.
- Yadav, A.S. (2009). Biosecurity: A thrust area to prevent avian influenza and other poultry diseases. In P.V.K. Sasidhar (Ed.), *Proceedings of a National Seminar: Poultry Research Priorities to 2020*, Izatnagar, India, November 2-3, 2006, pp. 184-192. Acedido em 15 de Maio de 2009 em <http://www.icar.org.in/cari/lead%20papers.pdf#page=191>.
- Yee, K. S., Carpenter, T. E. & Cardona, C. J. (2009). Epidemiology of H5N1 avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 325-340.